

Institut für Veterinärpharmakologie und –toxikologie
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. Felix R. Althaus

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von
Dr. med. vet. Flurina C. Clement Frey, PhD

Genotoxizität von Formaldehyd: Hemmung der DNA-Reparatur

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Regula Simone Meier Wartberger

Tierärztin
von Kirchberg St.Gallen und Mettauertal Aargau

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. H. Naegeli, Referent

PD Dr. Andreas Luch, Korreferent

Zürich 2013

Institut für Veterinärpharmakologie und –toxikologie
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. Felix R. Althaus

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von
Dr. med. vet. Flurina C. Clement Frey, PhD

Genotoxizität von Formaldehyd: Hemmung der DNA-Reparatur

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Regula Simone Meier Wartberger

Tierärztin
von Kirchberg St.Gallen und Mettauertal Aargau

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. H. Naegeli, Referent

PD Dr. Andreas Luch, Korreferent

Zürich 2013

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	2
1.1 Summary	3
2. Einführung	4
2.1 Vorkommen von Formaldehyd	4
2.2 Grenzwerte	5
2.3 Aufnahme	5
2.4 Toxizität	6
2.5 Molekularer Mechanismus der Formaldehydtoxizität	7
2.6 Kontaktallergien durch Formaldehyd	9
2.7 Die Bedeutung der Haut	10
2.8 Das UV-Licht	11
2.9 DNA-Reparatur von UV-Schäden	11
2.10 Basen-Exzisionsreparatur	13
2.11 Weitere in dieser Arbeit verwendeten genotoxischen Substanzen	14
2.12 Analyse der Proteindynamik in lebenden Zellen	16
2.13 Zielsetzung	18
3. Material und Methoden	19
3.1 Chemikalien	19
3.2 Antikörper	19
3.3 Vektoren	20
3.4 Zellkultur und Medien	20
3.5 Kulturbedingung	21
3.6 Transfektion	21
3.7 Reparatur-Assay	21
3.8 Bestimmung der UV-Läsionen mittels ELISA	23
3.9 Bestimmung der Proteinmobilität	25
3.10 Western-Blots	26
3.11 Statistik	26
4. Resultate	27
4.1 Dynamik der individuellen Reparaturfaktoren	27
4.1.1 Proteinmobilität	27
4.1.2 Die nukleäre Mobilität von DDB2 in Abhängigkeit von Formaldehyd	28
4.1.3 Die nukleäre Mobilität von XPC in Abhängigkeit von Formaldehyd	32
4.1.4 Die nukleäre Mobilität von OGG1 und APE1 in Abhängigkeit von Formaldehyd	34
4.2 Effekt von Formaldehyd auf die Reparatur verschiedener DNA-Schäden	35
4.2.1 Reparatur-Assay	35
4.2.2 Reparatur von 6-4 Photoprodukten in der chromosomalen DNA	38
5. Diskussion	40
5.1 Formaldehyd und UV-Licht	40
5.2 Wirkung von Formaldehyd auf DDB2	41
5.3 Wirkung von Formaldehyd auf XPC	42
5.4 Wirkung von Formaldehyd auf BER-Enzyme	43
5.5 Messung von Reparaturaktivitäten	44
5.6 Schlussfolgerung	46
6. Referenzen	48
7. Danksagung	
8. Curriculum vitae	

1. Zusammenfassung

Formaldehyd ist ein im Alltag verbreiteter Giftstoff, der zum Beispiel bei der Produktion von Spanplatten sowie in der Textilindustrie als Bindemittel verwendet wird. In der Kosmetikbranche wird Formaldehyd als Konservierungsmittel genutzt. Auch dient diese Substanz als Fixationsmittel für biologisches Gewebe. Eine bedeutende Exposition erfolgt nicht nur über die Atemwege sondern auch durch direkten Hautkontakt.

In den Zellen führt diese reaktive Substanz zu einer Vernetzung der DNA mit Zellproteinen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Folgen der dabei entstehenden Quervernetzungen auf die DNA-Reparatur untersucht. Mit einer Fluoreszenzmethode („fluorescence recovery after photobleaching“) wurde die Beweglichkeit von Untereinheiten des DNA-Reparatursystems in der Gegenwart von Formaldehyd im tiefen Dosisbereich geprüft. In weiteren Versuchen wurde getestet, ob die Reparatur von UV-Schäden, die auf der DNA liegen, durch Formaldehyd beeinflusst wird. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Formaldehyd rasche zelluläre Bewegungen von Reparaturproteinen, welche für die Suche nach DNA-Schäden notwendig sind, einschränken. Dadurch kommt es zu einer ungenügenden Erkennung der Schäden und die Reparatur dieser potentiell mutagenen Läsionen ist vermindert. Aus diesen Modelluntersuchungen schliessen wir, dass der Hautkontakt mit Formaldehyd in Kombination mit UV-Strahlen des Sonnenlichtes oder künstlicher Quellen ein bisher vernachlässigtes Risiko für Hautkrebs darstellen könnte.

1.1 Summary

Formaldehyde is a widely spread toxic compound frequently encountered in everyday life. It is known as a binding agent in the production of plywood and textiles. Formaldehyde is also found in cosmetics for preservation and it is used for the fixation of biological tissues. A substantial exposure takes place not only via inhalation but also through direct skin contact and penetration.

In cells, this reactive compound has been shown to crosslink proteins to the DNA filament. In the present thesis, we examined the effects of the resulting DNA-protein crosslinks on DNA repair activity. We analyzed the protein dynamics of subunits of the DNA repair system using a fluorescence-based method (fluorescence recovery after photobleaching). In further assays, we tested whether formaldehyde inhibits the excision of UV-induced lesions arising in the DNA of living cells. Our results indicate that formaldehyde impedes the rapid nuclear movements of repair proteins involved in the search and recognition of DNA damage. As a consequence of this insufficient damage recognition, the subsequent excision of potentially mutagenic DNA lesions is reduced. In view of these findings obtained in an experimental model system, we conclude that the direct contact with formaldehyde, in conjunction with UV radiation from sunlight or artificial sources, may represent an unexpected and as yet unrecognized risk factor for skin cancer.

2. Einführung

2.1 Vorkommen von Formaldehyd

Formaldehyd ist eine weit verbreitete giftige Substanz, die wir als Verbraucher in ganz unterschiedlichen Bereichen des Alltags antreffen (Flyholm & Anderson 1993). Pro Jahr werden weltweit mehrere Tonnen dieser farblosen und stechend riechenden Chemikalie industriell produziert. Weitere grosse Mengen von Formaldehyd werden durch Verbrennungsprozesse (z.B. über Abgase, Zigarettenrauch und Kehrlichtverbrennungen) in die Umwelt oder Raumluft freigesetzt (IARC 2006).

Die Kosmetikindustrie verwendet vor allem Formaldehydabspalter als Konservierungsmittel, die nach und nach Formaldehyd freisetzen (De Groot & Veenstra 2010; Doi et al. 2010; Kireche et al. 2010). Formaldehyd ist ebenfalls in Klebstoffen und Bindemitteln enthalten, weshalb unter anderem Spanplatten, Polstermöbel, Holzspielzeuge und Teppiche kontinuierlich diesen Giftstoff abgeben (Quievryn et al. 2000; Pickrell et al. 1983; Andersen et al. 1975). Seit neustem werden vom Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin, welches sich schon seit Jahren mit der Gefährlichkeit von Formaldehyd befasst, auch Haarglättungsmittel genauer auf deren Gehalt an Formaldehyd untersucht. Textilien aus Baumwolle und Viskose werden häufig durch die Zugabe von Formaldehydharzen formbeständiger. Solche Kleidungsstücke, die Formaldehyd enthalten, sollten deshalb vor dem ersten Gebrauch gewaschen werden, damit es zu keinen Hautunverträglichkeiten kommt (Sanath et al. 2004). In medizinischen Kreisen ist Formaldehyd weit verbreitet, da es als Konservierungsmittel für Gewebeprobe verwendet wird. Die keimtötende und fixierende Eigenschaft kommt durch eine Wechselwirkung zwischen dem elektrophilen Carbonylatom von Formaldehyd mit den Aminogruppen der Proteine zustande (Ma & Harris 1988).

Der menschliche Körper enthält natürlicherweise eine geringe Konzentration von Formaldehyd. Dieses entsteht z.B. durch den Abbau der Aminosäuren Glycin und Serin. Auch wird Formaldehyd für die Synthese von

Purinbasen verwendet. Die physiologische Blutkonzentration von Formaldehyd beträgt gemäss Literatur zwischen 13 und 97 $\mu\text{mol/Liter}$ (Lehmann 2010; Swenberg et al. 2010; Ridpath et al. 2007).

2.2 Grenzwerte

In Mundpflegemitteln (P. Altmeyer Enzyklopädie der Dermatologie) wie auch in Nagelhärter ist Formaldehyd als Inhaltsstoff erlaubt (De Groot et al. 1988). Hier gibt es aber einen festgelegten Grenzwert, welcher nicht überschritten werden darf. Es ist vorgegeben, dass Mundpflegemittel nicht mehr als 0.1% der Substanz Formaldehyd enthalten dürfen. Der Grenzwert bei Nagelhärtern wird bei 0.5% festgelegt (Sainio et al. 2006) Die tiefere Toleranz bei den Mundpflegemitteln ist damit zu erklären, dass Formaldehyd hier direkt mit der Mundschleimhaut in Kontakt kommt.

In kosmetischen Produkten muss der Zusatzstoff Formaldehyd deklariert werden, wenn die freie Formaldehyd-Konzentration mehr als 0.05% beträgt. Erlaubt sind laut der EU maximal 0.2% ungebundenes Formaldehyd in kosmetischen Mitteln (Kireche et al. 2010; Emri et al. 2004). Das Deutsche Bundesamt für Gesundheit hat für Formaldehyd einen Richtwert von 0.1 ppm (parts per million) für die Innenraumlufte definiert, welcher auf jeden Fall eingehalten werden muss. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat einen Richtwert für die Raumlufte veröffentlicht und dabei bereits einen Wert von > 0.083 ppm als kritisch bewertet.

2.3 Aufnahme

Formaldehyd wird über zwei verschiedene Wege aufgenommen. Es kann über die Atemwege in unseren Körper gelangen oder durch den direkten Kontakt mit der Haut (Emri et al. 2004; Quievryn et al. 2000). Eine hohe Formaldehydbelastung wird in Wohnräumen erreicht, da zum Beispiel Teppichböden und Möbel Formaldehyd enthalten und diese giftige Substanz über Jahre fortlaufend abgeben (Li et al. 2010). Da Formaldehyd hauptsächlich bei Feuchtigkeit freigesetzt wird, verringert eine trockene

Innenluft die Formaldehydbelastung in Wohnräumen (Arundel et al. 1986). Auch erhöht Zigarettenrauch die Exposition mit Formaldehyd (Godish 1989). Daneben kann es durch direkten Kontakt mit formaldehydhaltigen Gebrauchsartikel oder Kosmetika zur Penetration durch die Haut kommen (Robbins et al. 1984).

2.4 Toxizität

Über die Bildung von DNA-Protein-Vernetzungen (Abb. 1) verursacht Formaldehyd sowohl Chromosomenbrüche wie auch Mutationen (Li et al. 2010). Dieser Giftstoff übt seine Wirkung primär im Bereich des ersten Kontaktes aus. Die Epithelien des Nasen-Rachenraums und die Haut können dadurch stark durch Formaldehyd belastet werden, weil 90% des inhalierten Formaldehyds im oberen Respirationstrakts absorbiert wird (IARC 2006). Bei erhöhter Luftkonzentration von Formaldehyd werden akute Respirationserkrankungen beobachtet (Tuthill 1984). Eine Exposition von Formaldehyd in den Wohnräumen kann bei Kindern Asthma auslösen (Rumchev et al. 2002).

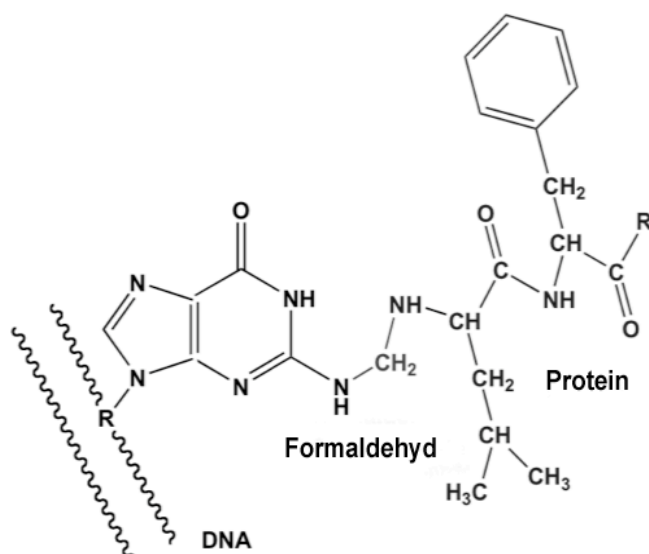


Abb. 1. Formaldehydinduzierte Quervernetzung zwischen einer Base der DNA und Proteinresten

Bei Ratten und Mäusen kann Formaldehyd Plattenepithel-Karzinome in der Nasenschleimhaut verursachen (Monticello et al. 1996; Kerns et al. 1983; Swenberg et al. 1980). Dementsprechend wurde angenommen, dass formaldehydexponierte Personen ein erhöhtes Krebsrisiko für den oberen Respirationstraktes tragen. Im Jahre 2006 stufte die „International Agency for Research on Cancer“ (IARC) Formaldehyd als krebserregend für den Menschen ein (IARC 2006). Eine Metaanalyse epidemiologischer Studien bis zum Jahre 2007 zeigte jedoch auf, dass formaldehydexponierte Personen kein erhöhtes Risiko für diese Krebsform tragen (Bosetti et al. 2008). In einem weiteren Beitrag aus dem Jahre 2007 wurde beschrieben, dass die an nasopharyngealem Krebs erkrankten Personen an ihrem Arbeitsplatz Kontakt nicht nur mit Formaldehyd, sondern auch mit anderen Stoffen hatten. Diese beruflich exponierten Personen arbeiteten nämlich in der Metallindustrie, wo weitere giftige Stoffe (Schwefelsäure, Mineralsäure und Metallstaub) zur erhöhten Inzidenz von nasopharyngealem Krebs (Marsh et al. 2007) führen konnten.

Wird Formaldehyd in verschiedenen Konzentrationen (1% bzw. 10%) über eine Experimentendauer von 60 Wochen auf die Haut von Mäusen aufgetragen, konnten keine Tumore ausgelöst werden. Weitere Studien ergaben jedoch, dass die Latenz für Hautkrebs, verursacht durch das stark kanzerogene polyzyklische Kohlenwasserstoff DMBA, zusammen mit der Applikation von Formaldehyd stark verkürzt wurde (Iversen 1986). Diese Beobachtung deutet auf eine ko-karzinogene Wirkung von Formaldehyd in der Haut hin. Eine kürzlich veröffentlichte epidemiologische Studie weist auch auf einen Zusammenhang zwischen vermehrter Formaldehydexposition und dem Risiko an myeloischer Leukämie zu erkranken (Zhang et al. 2010).

Niedrige Formaldehydkonzentrationen können Reizungen der Schleimhäute von Augen, Nasen und Rachen bewirken. Formaldehyd ist hochreaktiv und wird sehr schnell metabolisiert (IARC 1995).

2.5 Molekularer Mechanismus der Formaldehydtoxizität

Der Schleimhaut- oder Hautkontakt mit Formaldehyd stellt ein Problem dar, weil diese reaktive Substanz Quervernetzungen zwischen dem Träger der

Erbinformation, der Desoxyribonucleinsäure (DNA), und den Zellproteinen verursacht (Noda et al. 2011; Speit et al. 2000). Diese Vernetzungen finden hauptsächlich zwischen der DNA und den Histonproteinen im Zellkern statt (Cohen-Hubal et al. 1997; O'Connor and Fox 1989). Durch die Bildung der so genannten DNA-Protein-Crosslinks (DPX) kommt es zu einem Funktionsverlust der DNA, weil diese nicht mehr transkribiert und repliziert werden kann. Zusätzlich kommt es zu Genmutationen, das heisst zu irreversiblen Veränderungen der Nukleotidsequenzen (Recio et al. 1992). Ein grundsätzliches Problem ist, dass keine minimale Formaldehyd-Konzentration beobachtet wurde, bei denen es zu keiner Bildung von DPX kommt. Es wurde nachgewiesen, dass DPX so genannte prämutagene Läsionen darstellen, da es durch die Anlagerungen von Proteinen an die DNA häufiger zu Replikationsfehlern kommt (Swenberg et al. 2010). Ferner ist als erwiesen anzusehen, dass durch die endogene Formaldehydmenge (maximal etwa 100 μM im Blut) ebenfalls DPX verursacht werden (Swenberg et al. 2010).

Die DPX werden teilweise durch den Mechanismus der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) eliminiert. Dieser universelle Vorgang repariert auch noch andere DNA-Schäden wie zum Beispiel UV-induzierte Basen-Läsionen, aber auch DNA-Addukte verursacht durch Chemikalien. Typische Beispiele dafür sind DNA-Addukte, die durch Cisplatin (ein Chemotherapeutikum) oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (ein Gruppe von Umwelt- und Lebensmittelkontaminanten) verursacht werden. Einen wichtigen Beitrag bei der Reparatur der DPX hat jedoch die homologe Rekombination. Welcher der beiden Mechanismen zur Anwendung kommt, hängt von der Grösse der quervernetzten Proteinen ab. Bei kurzen mit der DNA vernetzten Polypeptiden ist der NER-Apparat an der Beseitigung der Schäden beteiligt, bei grösseren vernetzten Proteinen kommt eher die homologe Rekombination zum Zuge (Li et al. 2010). Eine andere Publikation weist darauf hin, dass die Art der Aufnahme von Formaldehyd bestimmt wie die DPX entfernt werden.

Bei einer chronischen Formaldehydbelastung mit tiefen Konzentrationen beobachtete man, dass diese DPX grösstenteils durch die homologe Rekombination eliminiert wurden. Eine akute Exposition im hohen

Dosisbereich aktiviert vor allem den NER-Mechanismus (De Graaf et al. 2009).

Prinzipiell gibt es noch andere Exzisionsmechanismen, welche DNA-Schäden reparieren können. Oxidative Schädigungen der DNA werden beispielsweise durch den Mechanismus der Basen-Exzisionsreparatur (BER) prozessiert (Friedberg et al. 2006; Lindahl 1993). Auf diese Vorgänge der DNA-Exzisionsreparatur wird später detaillierter eingegangen.

2.6 Kontaktallergien durch Formaldehyd

Früher wurde in der Kosmetikindustrie meist Formaldehyd als Konservierungsstoff verwendet. Heute verwendet man häufiger Formaldehyd-freisetzende Stoffe wie z.B. Bronopol. Diese zugesetzten Stoffe geben durch Hydrolyse langsam Formaldehyd ab. Ein grosses Problem ist dabei, dass viele formaldehyd-freisetzende Stoffe selbst hautallergene Wirkungen entfalten, wobei aber das allergene Potential von Formaldehyd noch grösser ist (De Groot & Veenstra 2010; Doi et al. 2010). Die heutige Prävalenz der Formaldehydallergien in europäischen Ländern beträgt 2-3%, hingegen reagieren nur 0.5-2% der Europäer allergisch auf formaldehyd-freisetzende Stoffe. Dementsprechend wurde darauf hingewiesen, dass die Deklaration des Inhaltsstoffes Formaldehyd und der formaldehyd-freisetzende Substanzen noch verbessert werden sollte (Lundov et al. 2010).

Formaldehyd wird nicht nur in Kosmetika sondern auch in Textilien verwendet. Durch Zugabe von Formaldehyd werden diese nämlich formbeständiger. In einer australischen Studie aus dem Jahre 2011 zeigten 30% der untersuchten Probanden Hautreaktionen auf Textilien, die Formaldehyd oder formaldehyd-freisetzende Stoffen enthalten (Slodownik et al. 2011).

2.7 Die Bedeutung der Haut

Die Haut ist das grösste Organ des menschlichen Körpers und besitzt eine Anzahl verschiedener Funktionen (Afaq 2011). Unsere Haut schützt uns vor chemischen, thermischen und auch mechanischen Schäden (Merk et al. 2006). Auch ist die Haut eine wichtige Schutzbarriere gegen UV-Strahlen (Afaq 2011). Wenn diese Hautbarriere undicht ist, können Allergene (wie zum Beispiel Tierhaare, Pollen und Hausstaubmilben), mit denen wir jeden Tag in Kontakt kommen, in die oberste Hautschicht eindringen und sich verheerend auf das Immunsystem auswirken. Die Folge davon sind dann Allergien und Ekzeme (Watson 2011).

Aber auch eine intakte Haut kann geschädigt werden. Eine häufige Ursache ist die übermässige Exposition gegenüber UV-Strahlungen (Brash et al. 1991). Dabei kann es zu einem Erythem (Sonnenbrand) kommen, da die eindringenden UV-Strahlungen eine Entzündungsreaktion der Haut hervorrufen. Wenn die Belastung der Haut durch UV-Strahlungen extrem ist, kann es sogar zu Verbrennungen mit Blasenbildungen kommen. Der Körper reagiert darauf mit Fieber und Übelkeit. Als Schutzwall gegen UV-Strahlungen sind die Melanozyten in der Epidermis gelagert. Diese pigmentbildenden Zellen besitzen einen Farbstoff, das Melanin, welcher imstande ist die einfallende UV-Strahlung zu absorbieren und eine Schädigung von tiefergelegenen Zellen zu verhindern. Daher sind dunkelhäutige Menschen besser vor UV-Strahlungen geschützt (Slominski et al. 2004). Ferner sind die Hautzellen fähig, Schadstellen in ihrer DNA, welche durch UV-Strahlungen verursacht werden, bis zu einem gewissen Grad zu beheben oder – „reparieren“ (Armstrong et al. 2001). Wird aber dieser Reparaturmechanismus ausgeschöpft, kommt es zu sogenannten „sunburn-cells“.

Eine chronische Überexposition gegenüber UV-Strahlungen führt zu Faltenbildung, Trockenheit und Gelbfärbung der Haut. Wegen der Belastung mit UV-Strahlungen kommt es schliesslich zu bösartigen Hautveränderungen (Baron et al. 2010; Gonzaga 2009;). Somit stellt die Haut eine lebenswichtige Schutzbarriere dar und wenn diese nicht mehr gewährleistet wird, kann es zu Allergien kommen oder anderen gesundheitlichen Problemen mit manchmal fatalen Folgen.

2.8 Das UV-Licht

Der UV-Bereich befindet sich im kurzwelligen Licht zwischen 200 und 400 nm Wellenlänge. Durch Einwirkung von UV-Licht kann es zu chromosomalen Schädigungen der Hautzellen kommen. Die Art des Schadens und die Reparatur sind abhängig von der Wellenlänge des Lichtes. Das UV-C-Licht (190-290 nm Wellenlänge) wird durch eine intakte Ozonschicht absorbiert und erreicht die Erdoberfläche nicht. Das UV-B-Licht (290-320 nm) verursacht wie UV-C hauptsächlich Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD; Abb. 2) und (6-4)-Photoprodukte (6-4PP; Abb. 3) (Ikehata et al. 2011). Diese beiden Schädigungen werden durch den Mechanismus der NER eliminiert (Hoeijmakers 2009; Friedberg et al. 2006). UV-A-Strahlungen (320-400 nm) verursachen vor allem CPD und oxidative Basen-Schädigungen (Emri et al. 2004).

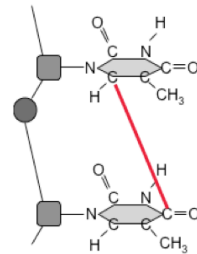
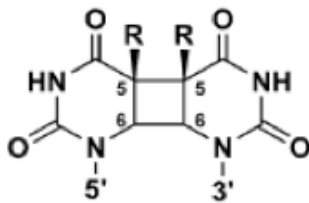


Abb. 2. Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer

Abb. 3. (6-4)-Photoprodukt

In dieser Darstellung werden nur die miteinander vernetzten Basen gezeigt

2.9 DNA-Reparatur von UV-Schäden

Wie bereits erwähnt ist der NER-Vorgang für die Reparatur von verschiedenen DNA-Addukten zuständig (Abb. 4). Dieser Reparaturmechanismus wird in zwei Unterpfade gegliedert. Die *globale Genomreparatur* (GGR = global-genome repair) ist zuständig für Läsionen irgendwo auf der DNA (Clement et al. 2010). Dabei erkennt das Sensorprotein Xeroderma Pigmentosum C (XPC) die von DNA-Addukten verursachte Verzerrung der Doppelhelix (Maillard et al. 2007). Mittels XPC kommt es zur Rekrutierung des Transkriptionsfaktors TFIIH, welche für die Öffnung des DNA-Doppelstranges zuständig ist (De Laat et al. 1999). Danach werden XPA

und das Replikationsprotein A (RPA) in den Reparaturkomplex eingebunden (Camenisch et al. 2006). RPA schützt den unbeschädigten komplementären Strang vor endonukleolytischer Spaltung und stellt ein wichtiges Gerüst für die Endonukleasen XPG und XPF dar (Iftode et al. 1999). Diese beiden Endonukleasen schneiden ein Nukleotidsegment von 24-32 Einheiten inklusive des Schadens von der DNA heraus (Camenisch et al. 2006). Eine DNA-Polymerase füllt die entstehende Lücke sofort wieder auf und der reparierte Strang wird mit einer DNA-Ligase wieder verknüpft (Lehman 1974).

Der andere Pfad der NER-Reaktion wird *Transkriptions-abhängige Reparatur* (TCR = transcription-coupled repair) genannt. Bei diesem Vorgang erkennt die RNA-Polymerase II den Schaden auf der DNA während der laufenden Transkription. Die aufgehaltene RNA-Polymerase II rekrutiert die beiden Cockayne-Syndrom Proteine CSA und CSB an die geschädigte DNA-Stelle. Danach werden die schon aufgelisteten Reparaturproteine (TFIIH, XPA, RPA, XPG und XPF) an die Schadstelle geholt um diese auszuschneiden. Das XPC-Protein ist nicht an diesem Transkriptions-abhängigen Reparatur-Mechanismus beteiligt (Andressoo and Hoeijmakers 2005).

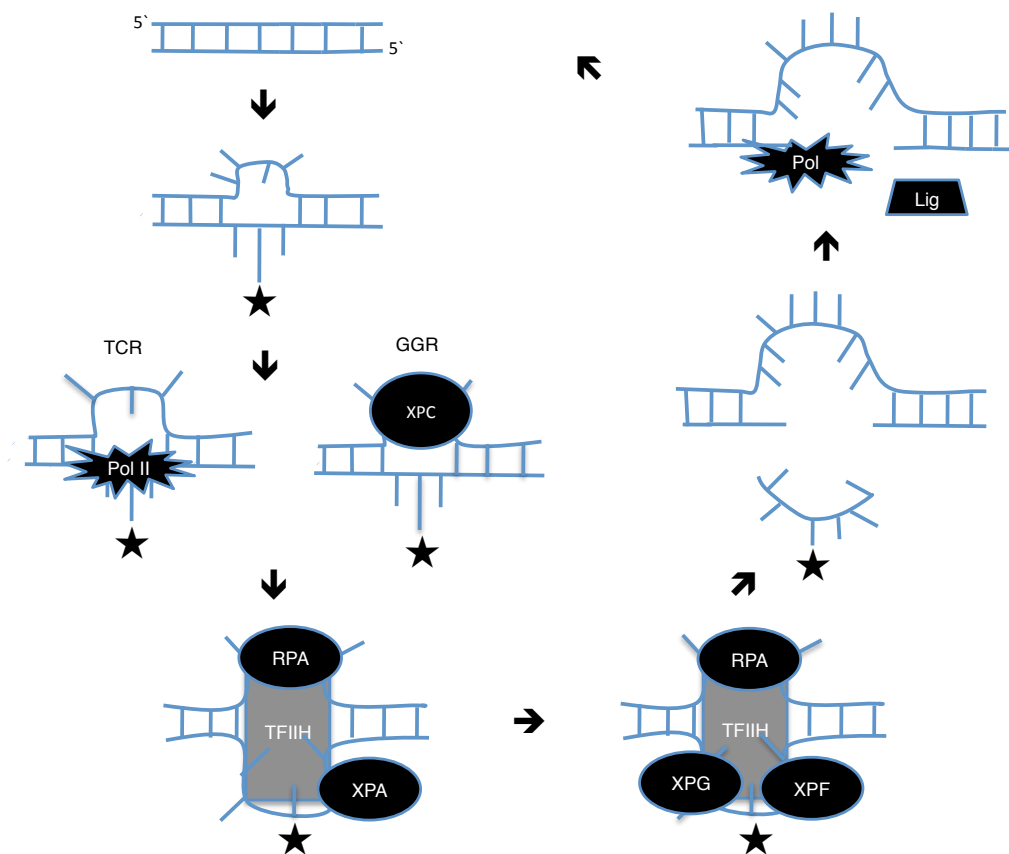


Abb. 4 . Schematische Darstellung der enzymatischen Entfernung von DNA-Addukten durch NER-Aktivität. Das DNA-Addukt wird durch einen Stern symbolisiert. Die Schadstelle wird entweder von XPC (GGR-Pfad) oder der RNA-Polymerase II (Pol II) aufgespürt (TCR-Pfad). Das Reparaturprotein A (RPA) schützt den unbeschädigten Strang. Nachdem XPG und XPF den Schaden herausgeschnitten haben, füllt eine DNA-Polymerase die Lücke auf und die DNA-Ligase verknüpft den reparierten Strang.

2.10 Basen-Exzisionsreparatur

UV-A-Strahlen verursachen nicht nur CPD sondern auch oxidative DNA-Schädigungen (Maynard et al. 2009; Lindahl 1993), zum Beispiel 8-Oxo-Guanine, die vorwiegend über den Prozess der Basen-Exzisionsreparatur

(BER; Abb. 5) entfernt werden (Krokan et al. 2000). Dabei wird die geschädigte oder veränderte Base zuerst durch eine DNA-Glycosylase, z.B. 8-Oxo-Guanine-Glycosylase 1 (OGG1) entdeckt und von der DNA-Doppelhelix ausgeschnitten (Krokan et al. 2000). Durch diesen Vorgang kommt es zu einer Öffnung im Phosphat-Ribose-Rückgrat. Das Enzym AP-Endonuklease schneidet das Phosphat und die Ribose weg, eine DNA-Polymerase füllt das fehlende Nukleotid wieder auf und die Ligase verknüpft das neu synthetisierte Nukleotid mit den bereits vorhandenen (Baute & Depicker 2008).

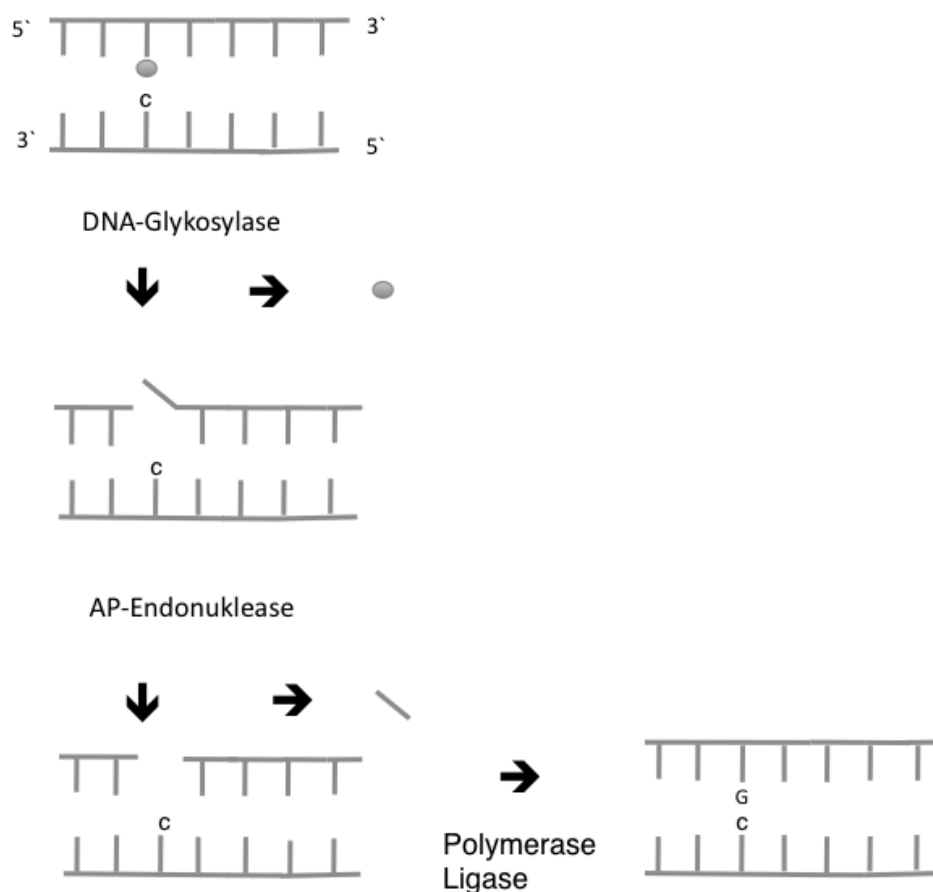


Fig 5. Schema der BER-Reaktion auf eine oxidative Guanin-Schädigung

2.11 Weitere in dieser Arbeit verwendeten genotoxischen Substanzen

Bei der metabolischen Oxidation von Alkohol zu Essigsäure entsteht das Zwischenprodukt Acetaldehyd (Guo et al. 2010). Dieser reaktive Metabolit ist

dafür verantwortlich, dass wir uns nach exzessivem Alkoholkonsum am nächsten Tag unwohl fühlen. Wie Formaldehyd (Abb. 6) ist auch Acetaldehyd (Abb. 7) in der Lage, DPX zu bilden. Daneben verursacht Acetaldehyd auch Quervernetzung innerhalb der DNA-Doppelhelix. (Garcia et al. 2009). Es wurde auch beschrieben, dass sich Acetaldehyd durch den elektrophilen Charakter noch zusätzlich mit Lipiden quervernetzen kann (Setshedi et al. 2010). Acetaldehyd begegnet uns auch in den verschiedensten Bereichen des Alltags und kommt in Obst und Gemüse natürlicherweise vor (Pesis et al. 2002; Ke et al. 1993). PET-Flaschen enthalten auch Acetaldehyd, welches in geringen Mengen in die Flüssigkeit übergehen kann (Mutsuga et al. 2005; Nijssen et al. 1996). Das europäische Lebensmittelrecht beinhaltet nur einen Acetaldehyd-Grenzwert für Neutralalkohole, für alle anderen Produkte sind keine Grenzwerte definiert (Lachenmeier et al. 2008). Dieses Gesetz ist doch erstaunlich bei der Berücksichtigung der Tatsache, dass Acetaldehyd als karzinogen eingestuft wird (Testino et al. 2010).

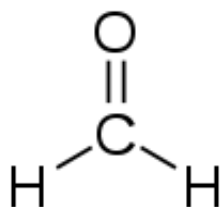


Abb. 6. Strukturformel von Formaldehyd

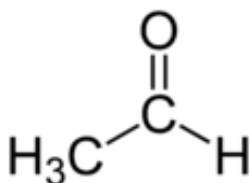


Abb. 7. Strukturformel von Acetaldehyd

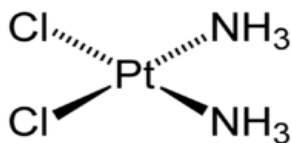


Abb. 8. Strukturformel von Cisplatin

Formaldehyd und Acetaldehyd sind nicht die einzigen Substanzen, welche Quervernetzungen der DNA zur Folge haben. Cisplatin (Abb. 8), ein wichtiges Chemotherapeutikum für die Krebsbehandlung, ist in einem geringeren Ausmass ebenfalls fähig, DPX zu erzeugen (Chu 1994). Im Gegensatz zu Formaldehyd verursacht Cisplatin jedoch vor allem DNA-Addukte. Diese

entstehen dadurch, dass das Metall kovalente Verbindungen mit zwei benachbarten Purinbasen im selben DNA-Strang eingeht, seltener bildet Cisplatin Quervernetzungen zwischen den komplementären DNA-Stränge der Doppelhelix (Saldivar et al. 2007).

2.12 Analyse der Proteindynamik in lebenden Zellen

Eine zentrale Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass Formaldehyd die DNA-Reparaturfaktoren lahm legen könnte. In Anbetracht dieser Fragestellung haben wir die Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)-Methode gewählt, um die Proteinbeweglichkeit im Zellkern zu untersuchen. Diese Technik wurde entwickelt um die Dynamik von Proteinen in lebenden Zellen in Echtzeit zu prüfen (Edidin et al. 1976). Damit ist es auch möglich zu messen, wie mobil die untersuchten Proteine im Zellkern sind.

Zuerst werden die Zellen mit einem Vektor transfiziert, der zur Expression eines mit Green-Fluorescent Protein (GFP) konjugierten Faktors führt. Durch eine Laserbleichung wird dann die Eigenfluoreszenz in einem definierten Bereich irreversibel ausgebleicht. Danach wird das Wiedererreichen der Anfangsintensität im definierten Bereich verfolgt (Abb. 9). Die Kopplung mit dem GFP hat in der Regel keine Auswirkungen auf die Funktion und die Lokalisation des konjugierten Zielproteins (Reits et al. 2001). Kommt es im FRAP-Experiment zu einer schnellen Erholung der Intensität, sind die untersuchten Proteine vollständig mobil. Theoretisch würde bei totaler Unbeweglichkeit des Zielproteins die gebleichte Region schwarz bleiben. Der häufigste Fall ist jedoch, dass die getesteten Proteine nur bis zu einem gewissen Grade mobil sind. Hierbei kommt es zu einer nichtvollständigen Erholung der Fluoreszenzintensität (Abb. 9 und 10). Dieser Verlust der Eigenbeweglichkeit resultiert aus Interaktionen mit anderen Zellstrukturen (Cardarelli et al. 2009) wie z.B. der geschädigten DNA-Doppelhelix.

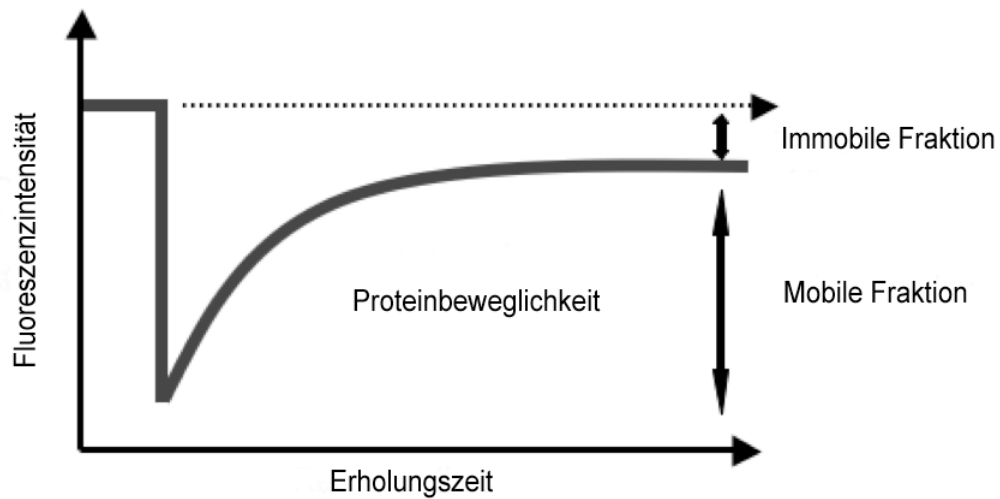


Abb. 9. Die Erholungszeit nach der Bleichung wird über die Zeit quantifiziert und mit der Fluoreszenz am Anfang des Experiments normalisiert. Ein irreversibler Verlust der Fluoreszenz deutet auf eine unbewegliche Fraktion hin.

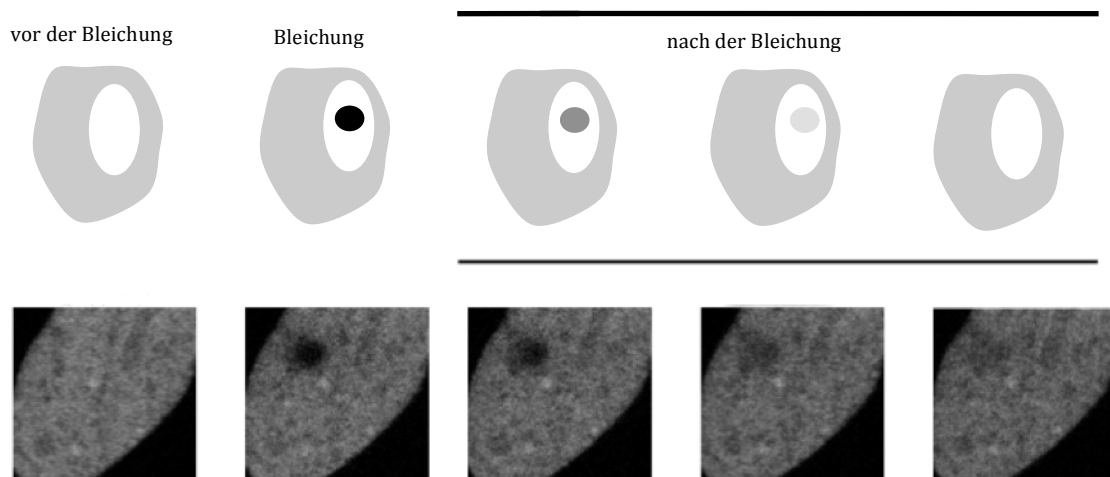


Abb. 10. Typisches Beispiel eines FRAP-Experimentes, die Bleichung mit einem Argonlaser verursacht eine Auslöschung der Eigenfluoreszenz des GFP-konjugierten Faktors (schwarzer Bereich). Durch Diffusion nach der Bleichung wird die Fluoreszenz kontinuierlich wiederhergestellt. Mit dieser Methode lässt sich die Beweglichkeit von Reparaturproteinen in Zellkern vergleichen.

2.13 Zielsetzung

Es gab in der Literatur verschiedene Hinweise, dass Formaldehyd die DNA-Reparatur von verschiedenen Schäden verlangsamen könnte (Quievryn et al 2000; Emri et al. 2004). Die wichtigste Zielsetzung dieser Dissertation war zu untersuchen, über welchen Mechanismus Formaldehyd diese DNA-Reparaturvorgänge in menschlichen Hautzellen beeinflusst. Ferner wollten wir bestimmen, ab welcher Dosis von Formaldehyd die Reparatur der DNA-Schäden vermindert ist und welche Faktoren dabei beteiligt sind.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Formaldehyd wurde von der Firma Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz) bezogen. Wir benutzten eine 36%ige wässrige Lösung. Acetaldehyd und kristallines Cisplatin (cis-Diammineplatinum(II)dichlorid) waren von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz).

3.2 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden für Western-blots oder ELISA-Verfahren eingesetzt. Der monoklonale GAPDH-Antikörper (AM 4300) war von Applied Biosystem (Rotkreuz, Schweiz). Wir verwendeten eine Verdünnung von 1:100'000, dabei wurde der Antikörper mit 3% bovinem Serumalbumin (BSA) und 0.1% Natriumacetat in 12 ml 2.5% TBST-Milch (Tris-Buffered Saline Tween-20) aufgelöst. Der monoklonale FLAG-Antikörper (F3165) wurde in der Verdünnung 1:1'000 verwendet und wie oben beschrieben mit BSA und Natriumacetat verdünnt. Bezogen haben wir diesen Antikörper von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz). Der monoklonale DDB2-Antikörper (2246C4a) wurde von Abcam (Luzern, Schweiz) gekauft. Wir verdünnten diesen Antikörper 1:50 mit 3% BSA und 0.1% Natriumacetat in 12 ml 2.5% TBST-Milch. Den polyklonalen Ubiquitin-Antikörper (89899) bezogen wir von Pierce (Rockford IL, USA). Wir verwendeten eine Verdünnung von 1:100'000 mit BSA und Natriumacetat in 12 ml einer 2.5% TBST-Milchmischung. Den monoklonalen XPC-Antikörper (6264) bezogen wir von Abcam (Luzern, Schweiz). Wir verwendeten diesen Antikörper 1:1'000 verdünnt mit 3% BSA und 0.1% Natriumacetat in 2.5% TBST-Milch. Den monoklonalen Antikörper gegen (6-4) Photoprodukte (NMDND002) bezogen wir von der Firma Cosmo Bio (California, USA). Die Verdünnung war 1:1'500 mit BSA und Natriumacetat wie oben bereits beschrieben.

3.3 Vektoren

Die beiden Vektoren pGL3 und RLTK wurden von der Firma Promega (Dübendorf, Schweiz) bezogen. Der Vektor für DDB2-FLAG wurde von Dr. Jia Fei in unserem Institut kloniert. Das Plasmid pEGFP-Ubi bezogen wir von der Firma Addgene (Cambridge, USA).

Das Plasmid pEGFP-APE1-C1 wurde uns von Dr. Hannes Lans (Erasmus University Medical Center, Rotterdam, Holland) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pEGFP-hOGG1-C1 erhielten wir von Dr. Pablo Radicella, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moleculaire, Fontenay-aux-Roses, Frankreich. Das Plasmid pEGFP-DDB2-C1 war ein Geschenk von Dr. Stuart Linn (University of California, Berkeley, USA).

3.4 Zellkultur und Medien

Wir benutzten folgende Zelllinien für die vorliegende Arbeit:

U2OS ist eine humane Osteosarkom-Zelllinie. Die Fibroblasten (GM00637) sind Simian Virus 40-transformierte humane Fibroblasten vom Coriell Institute for Medical Research in Camden (New Jersey, USA). Auch die XP-C-Fibroblasten GM16093 sind Simian Virus 40-transformiert und vom Coriell Institute for Medical Research in Camden geliefert. Die HeLa-Zellen sind menschliche Zervixkarzinomzellen von Henrietta Lacks. Wir bezogen diese Zellen aus dem Labor von Dr. Pavel Janscak (Universität Zürich, Schweiz).

Für die Kultivierung benutzten wir folgende von GIBCO gelieferten Medien: DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) + GlutaMAX (21885) ergänzt mit 10% fetalem bovinem Serum (FBS), 0.1 U/ml Penicillin und 0.1 µg/ml Streptomycin, wurden verwendet für Fibroblasten, XP-C-Fibroblasten und HeLa-Zellen. Das Medium DMEM von Sigma (D6428) verwendeten wir für die U2OS-Zellen, komplettiert mit 10% fetalem bovinem Serum (FBS), 0.1 U/ml Penicillin und 0.1 µg/ml Streptomycin. Inkomplettes Medium besteht aus DMEM ohne Zusatz von FBS und Penicillin/Streptomycin.

3.5 Kulturbedingung

Alle unsere Zellen wurden in dem Inkubator Heraeus Hera Cells 240 (Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Der Inkubator ist wassergesättigt und wurde auf eine Temperatur von 37°C eingestellt. Die Atmosphäre bestand aus 95% Luft und 5% CO₂ und die Luftfeuchtigkeit war gesättigt.

3.6 Transfektion

Die Zellen wurden immer nach dem gleichen Prinzip transfiziert. Man pipettierte die gewünschte Menge des Vektors in 1.5 ml Röhrchen und mischte die Vektoren mit inkomplettem Medium (pro 1 µg Vektor benutzten wir 100 µl inkomplettes Medium) und FuGENE HD (Roche). Die Proben wurden kurz mit einem Vortex gemischt und rasch zentrifugiert. Danach liessen wir das ganze Gemisch für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen und gaben es danach zu den Zellen. Nach 4 Stunden ersetzten wir das inkomplette Medium mit komplettem Medium und liessen die Zellen über Nacht im Inkubator stehen.

3.7 Reparatur-Assay

Der Host-cell Reactivation Assay ist in der Lage zu messen, wie Zellen DNA-Schäden auf Plasmiden reparieren können. Für die Schädigung des pGL3-Reportervektors wurde dieser mit einer UV-C Lampe (256 nm Wellenlänge) bestrahlt (Dosis: 1'000 J/m²). Der ungeschädigte pRLTK-Vektor diente dabei als interne Kontrolle.

Fibroblasten wurden mit den beiden Chemikalien (Formaldehyd oder Acetaldehyd) vorbehandelt. Zu diesem Zweck wurden von einer 175-cm²-Flasche (Nunc) je 500'000 Zellen in 6-well-Platten mit 2 ml komplettem Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen transfiziert. Wenn die Zellen mit mehreren Konstrukten gleichzeitig transfiziert wurden, haben wir 0.45 µg pGL3 und 0.05 µg pRLTK eingesetzt. Bei einer alleinigen Transfektion

mit den Reportervektoren nahmen wir insgesamt 1.0 µg Plasmid-DNA, 0.9 µg vom pGL3 und 0.1 µg pRLTK.

Der geschädigte pGL3-Vektor und der unbeschädigte pRLTK-Vektor wurden in einem Verhältnis von 10:1 miteinander gemischt. Der pGL3-Vektor kodiert für die Firefly (*Photinus*)-Luciferase, pRLTK für die *Renilla*-Luciferase. Mit dem Transfektionsreagens FuGENE HD wurden die Zellen transfiziert (1 µg DNA => 4 µl FuGENE). Nach Zugabe des Transfektionsgemisches auf die Zellen, (FuGENE, 100 µl inkomplettes Medium und Plasmide) wurden die Fibroblasten noch zusätzlich mit Formaldehyd oder Acetaldehyd behandelt. Vier Stunden nach Zugabe wurde das inkomplette Medium abgesaugt und mit komplettem Medium ersetzt. Teilweise wurden die Zellen nochmals mit Formaldehyd oder Acetaldehyd behandelt. Nun liess man die Zellen über Nacht bei 37°C im Inkubator. Am nächsten Tag sammelten wir die Zellen mit je 500 µl Passiv-Lysispuffer (Promega) ein. Nach dem Einsammeln wurden die Röhrchen zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reagenzröhrchen transferiert. Im Überstand wurde durch Zugabe von Luciferin sowie das Stop&Glow-Gemisch (Dual Luciferase Reporter System von Promega) mittels Luminometer (Dynex) die Luciferaseaktivität bestimmt. Da die Luciferaseexpression ein Mass für die Reparaturaktivität der Zellen darstellt, kann durch die Messung der Lumineszenz direkt auf die Reparatur des pGL3-Vektors zurückgeschlossen werden.

Zum Studium der Reparatur von DNA-Schäden mit Cisplatin wurde der pGL3-Vektor mit Cisplatin inkubiert. Dazu wurde ein Platinationspuffer hergestellt (10 mM Tris pH=8, 1 mM EDTA) und der pGL3 Vektor zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen von Cisplatin versetzt (0 µM, 3 µM, 4.5 µM). Der pGL3 Vektor wurde für 24 Stunden bei 37°C mit diesen beiden Komponenten inkubiert und danach mit 100% Ethanol und 3 M Natriumacetat präzipitiert. Nach nochmaliger Inkubation bei -20°C für 24 Stunden zentrifugierte man den Vektor bei maximaler Geschwindigkeit für 30 Minuten und wusch ihn 3-mal mit 70% Ethanol. Nach dem Trocknen des Vektors mit der Vakuumzentrifuge konnten wir die Fibroblasten mit diesem cisplatingeschädigten Vektor transfizieren.

Um einen durch Sauerstoffradikale geschädigten pGL3-Vektor herzustellen, wurde 100 µl dieses Vektors unter eine Wolframlühlbirne (75 W, 120V) im Kühlraum auf Eis inkubiert. Wir verwendeten verschiedene Zeitpunkte (zwischen 0 und 60 Minuten) und hielten einen Abstand von 10 cm bzw. 20 cm ein. Vor der Bestrahlung wurde dem pGL3-Vektor 10 µl einer 20 µM Methylenblau-Lösung zugesetzt. Nach der Bestrahlung wurden die Vektoren wieder in Reaktionsröhrchen pipettiert und beim Erreichen der Raumtemperatur mit 5 µl einer 20%igen SDS-Lösung gemischt. Um das zugesetzte Methylenblau aus den Proben herauszuwaschen, wurde 200 µl Butanol (gesättigt mit Tris-EDTA) zugesetzt und bei voller Geschwindigkeit während 30 Sekunden zentrifugiert. Danach wurde die obere Phase abgenommen und der Vorgang solange wiederholt, bis kein Methylenblau in den Proben zu sehen war. Für die Präzipitierung des Plasmids wurde 5 M NaCl (ein Zehntel des Volumens) und 100% Ethanol (das doppelte Volumen) verwendet. Die Röhrchen wurden bei voller Geschwindigkeit während 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand danach verworfen. Die Vektoren wurden mit 70%igen Ethanol gewaschen und mit der Vakuumzentrifuge getrocknet. Am Schluss wurde die DNA in 20 µl Tris-EDTA-Puffer aufgelöst.

3.8 Bestimmung der UV-Läsionen mittels ELISA

ELISA steht als Abkürzung für Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Mit dieser Methode wollten wir nachprüfen, wieviele (6-4) Photoprodukte nach einer definierten Zeit repariert wurden in der Gegenwart oder Abwesenheit von Formaldehyd. Hierbei wurden 500'000 Fibroblasten in Petrischalen (10 x 35 mm) ausgesät. In einigen Petrischalen wurde noch 100 µM Formaldehyd hinzugefügt. Nach 4 Stunden wärmten wir die UV-Lampe für genau 10 Minuten auf. Das komplette Medium wurde abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 1 ml Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) gewaschen und das DPBS wieder sorgfältig entfernt. Nun wurden die Zellen mit 15 J/m² bestrahlt. In einigen Petrischalen haben wir 1.0 ml DPBS hinzugefügt und die Zellen direkt mit einem Zellschaber eingesammelt (Kondition 0 Stunden nach Bestrahlung). Zu den anderen Zellen wurde nochmals komplettes Medium

hinzugefügt und erst 3 Stunden später eingesammelt. Nach der Einsammlung wurden die Zellen bei 10'000 g für 15 Sekunden bei 4°C zentrifugiert.

Der ELISA-Assay wurde gemäss dem Protokoll von Cosmo BIO Cat # NMDND002 durchgeführt. Wir benutzten 0.003% Protamin-beschichtete 96-Well-Platten. Die DNA wurde mit einem Verfahren von Qiagen (QIAmp Blood Kit 51104) isoliert. Die Konzentration der DNA wurde danach mit einem Spectrophotometer (Ultraspec 2100pro, Biosciences) gemessen. Um die DNA zu denaturieren, wurde die gemessene DNA für 10 Minuten bei 100 °C gekocht und danach ins Eisbad gestellt für 15 Minuten. Die denaturierte DNA wurde danach auf die protaminbeschichtete 96-Well-Platte pipettiert (50 µl/Well) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wuschen wir die 96-well-Platte 5-mal mit 150 µl PBS-T pro Well (0.05% Tween-20 in PBS) und verteilten 150 µl 2%ige FBS pro Well. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wurde die Platte nochmals mit je 150 µl PBS-T gewaschen. Danach fügten wir je 100 µl des Antikörpers gegen (6-4)-Photoprodukte hinzu und inkubierten nochmals für 30 Minuten bei 37°C. Auch nach dieser Inkubation wuschen wir die Platten nochmals mit 150 µl PBS-T. Danach verteilten wir je 100 µl 1:2'000 verdünnte Biotin-F(ab)₂-Frgamente gerichtet gegen murine IgG (Zymed, Cat. No.62-6340) auf die 96-Well-Platte. Nach einer erneuten Inkubation bei 37°C für 30 Minuten sowie Waschen mit PBS-T wurde auf die Platte je 100 µl Peroxidase-Streptavidin (Zymed, Cat. No.43-4323), in einer Verdünnung von 1:1'000 in PBS, pipettiert. Die Inkubation wurde für 30 Minuten bei 37°C durchgeführt. Wieder haben wir die Platte mit je 150 µl PBS-T und 150 µl Citratphosphat-Puffer (5.10 g Zitronensäure-Monohydrat, 7.3 g Na₂HPO₄, in 1000 ml destilliertem Wasser) gewaschen. Nachdem der Citratphosphat-Puffer weggeleert wurde, verteilten wir pro Well 100 µl einer Mischlösung (8 mg o-Phenylene-diamine 8 mg, 4 µl H₂O₂ (38%), in 20 ml Citratphosphat-Puffer). Auch diese Lösung wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der letzten Inkubation verteilten wir 50 µl einer 2 M H₂SO₄-Lösung in alle Wells und stoppten so die Enzymreaktion. Die Absorption jedes einzelnen Wells wurde mit einem Spectrometer bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen.

3.9 Bestimmung der Proteinmobilität

Die Mobilität von Proteinen kann durch eine spezialisierte Methode, der FRAP-Methode, detektiert werden. FRAP steht als Abkürzung für Fluorescence Recovery after Photobleaching. Dabei handelt es sich um eine *in vivo* Zellstudie. Das Ziel dieser Methode ist es, den Einfluss von Chemikalien wie Formaldehyd, Acetaldehyd oder Cisplatin auf die Beweglichkeit von verschiedenen Proteinen zu messen. Als Kontrolle wurde auch der Effekt von UV-Bestrahlungen auf die Proteinbeweglichkeit untersucht. Hierfür wurden wieder Zellen transfiziert: 500'000 Fibroblasten wurden für 24 Stunden auf einem runden Deckglas (Milian AG) kultiviert und danach mit den Expressionsvektoren für DDB2-GFP, XPC-GFP, OGG1-GFP oder APE1-GFP transfiziert (FuGENE HD Reagents, Roche, Schweiz). Dem Transfektionsgemisch wurden 75 μ M Formaldehyd oder 3.6 mM bzw. 10.8 mM Acetaldehyd oder 5 μ M Cisplatin hinzugefügt. Bei einigen Experimenten wurden die Zellen noch zusätzlich zur Formaldehydbehandlung mit 10 J/m² über eine UV-C Lampe bestrahlt (Wellenlänge 254 nm). Nach 4 Stunden bei 37 °C wurde das Transfektionsgemisch mit komplettem Medium ausgetauscht und mit der gleichen Konzentration von Formaldehyd bzw. Acetaldehyd für weitere 18 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Für unsere FRAP-Experimente benutzten wir ein Leica TCS SP5 konfokales Mikroskop und ein 63-er Öl-Objektiv. Während des Versuches wurden die Zellen mit 5% CO₂ inkubiert und bei 37°C in einer Klimakammer gehalten. Im Nukleus wurde für 2.2 Sekunden mit einem Argon-Ionen-Laser (488 nm) eine Region von Interesse (region of interest: ROI) bei 50%iger Intensität gebleicht. Vor und nach der eigentlichen Bleichung wurden in einem Abstand von 120-ms Bilder aufgenommen. Im gleichen Zellkern dient eine vergleichbare ROI von selber Grösse als Referenz. Wir benutzten eine Scannerfrequenz von 1400 Hz und eine Format von 128 x 128 Pixeln. Die Intensität der gebleichten Region wurde korrigiert mit den Veränderungen in der ROI der Referenz.

3.10 Western-Blots

Fibroblasten wurden von einer 175 cm² Flasche (Nunc) in 6-well-Platten verteilt. Pro Well wurden 500`000 Zellen ausgesät. Nach der Behandlung mit 75 µM Formaldehyd über einen Zeitraum von 18 Stunden wurden die Zellen mit 200 µl Lämmli-puffer (1 M Tris-HCL pH=6.8, 5 ml 100% Glycerol, 1.5 g SDS (SDS, sodium dodecyl sulfate), 50 mg Bromphenolblau, 320 µl Beta-Mercaptoethanol) eingesammelt, während 10 Minuten bei 95°C gekocht und für 5 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Am Schluss wurde das ganze Zelllysate auf ein 10% SDS-Polyacrylamidgel (SDS, sodium dodecyl sulfate) geladen und für 50 Minuten bei 35 mA laufen gelassen. Danach wurden die Proteine vom Gel auf eine Membran (Immun-Blot PVDF Membrane von BIO-RAD) übertragen (während 120 Minuten bei 4°C und einer Spannung von 68 V). Die Membran wurde dann noch 1 Stunde bei 37°C auf einem langsamen Schüttler mit 5%-TBST-Milch behandelt um danach mit den verschiedenen Antikörpern inkubiert zu werden. Der 1. Antikörper, der gegen das gewünschte Protein gerichtet ist, wird für 1 Stunde auf dem langsamen Schüttler (74 rpm) mit der Membran inkubiert. Nach der einstündigen Inkubationszeit wird die Membran dreimal mit 2.5% TBST-Milch für 10 Minuten gewaschen um danach mit dem 2. Antikörper zu inkubieren. Für den Waschschrift wird eine schnellere Frequenz beim Schüttler verwendet (150 rpm). Nach wiederholtem Waschen mit 2.5% TBST-Milch und TBST können die gewünschten Proteinen mit der Entwicklungslösung SuperSignal (ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific, 5610 Wohlen) sichtbar gemacht werden.

3.11 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm Prism 5 for macintosh (GraphPad Prism) durchgeführt. Die Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test berechnet (nonparametric) und das Konfidenzintervall betrug 95 %.

4. Resultate

4.1 Dynamik der individuellen Reparaturfaktoren

4.1.1 Proteinmobilität

Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) ist eine Echtzeit-Methode zur Quantifizierung der Beweglichkeit von Fluoreszenzprotein-gekoppelten Molekülen. Fibroblasten wurden mit Hilfe eines Transfektionsagens (FuGENE) mit genetischen Konstrukten transfiziert, die für DDB2-GFP bzw. XPC-GFP kodieren. Somit wurden diese DNA-Reparaturfaktoren mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) markiert, um deren Beweglichkeit im Zellkern bestimmen zu können. Vor der Laser-Bleichung fluoresziert der Nukleus einheitlich grün wegen dem GFP-markierten Reparaturprotein (Abb. 11A, „Prebleach“). Mittels eines Argon-Lasers wird ein kleiner, genau definierter Bereich gebleicht, was zur Auslöschung der lokalen Fluoreszenz führt (Bleach). Es ist wichtig anzumerken, dass die hierfür verwendete Wellenlänge (488 nm) keine DNA-Schäden provoziert. Aufgrund der nachfolgenden Diffusion des markierten Proteins innerhalb des Zellkerns kommt es in der „Postbleach“-Phase zu einer zeitabhängigen Erholung der Fluoreszenz im gebleichten Bereich. Wie schnell sich die Fluoreszenz wieder erholt, hängt von der Mobilität des zu untersuchenden Proteins ab. Die Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität vor der Bleichung und nach der Erholungsphase wird als immobile Fraktion bezeichnet. Es könnte auch vorkommen, dass der gebleichte Bereich schwarz bleibt, wenn das Protein vollkommen immobil ist. Die Kopplung mit dem GFP hat nur sehr selten Auswirkungen auf die Funktion und die Lokalisation des Proteins (Reits et al. 2001). Eine FRAP-Analyse von GFP zeigte eine extrem schnelle Diffusion ohne immobile Fraktion, im Gegensatz zu DDB2-GFP, welches mehr Zeit brauchte, um die Anfangsfluoreszenz wieder zu erreichen (Abb. 11B). Dies zeigt, dass GFP ohne Fusionspartner nicht verantwortlich ist für die Reduktion der DDB2-Mobilität.

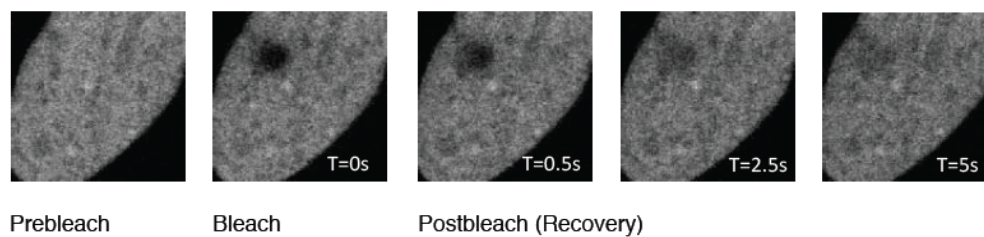
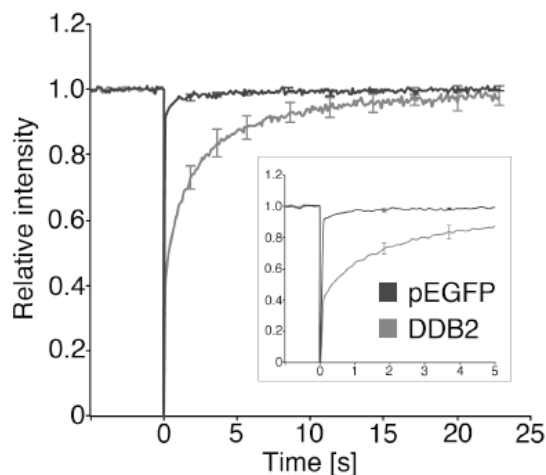
A**B**

Abb. 11. Darstellung einer Zelle während dem FRAP-Experiment. (A) Mit einem Argonlaser wird eine definierte Region gebleicht (Bleach). Die Erholung (Recovery) wird über die Zeit quantifiziert und mit der Anfangsintensität normalisiert. Die Differenz zwischen der Anfangsintensität und der Schlussintensität wird als immobile Fraktion bezeichnet.

In der Abbildung (B) wird die Quantifizierung eines FRAP-Experimentes gezeigt mit dem alleinigen GFP im Vergleich mit DDB2-GFP. Das Kästchen stellt vergrößert die FRAP-Kurve innerhalb der ersten 5 Sekunden dar.

4.1.2 Die nukleäre Mobilität von DDB2 in Abhängigkeit von Formaldehyd

Die initiale Erkennung von UV-Licht-induzierten DNA-Schäden erfolgt durch die Proteine DDB2 und XPC. Da man trotz widersprüchlichen Arbeiten davon ausgeht, dass kleinere DNA-Protein-Crosslinks (DPX) ebenfalls durch den NER-Mechanismus repariert werden (Minko et al. 2002; Reardon & Sancar et al. 2006; Li et al. 2010; Noda et al. 2011), testeten wir den Einfluss von Formaldehyd auf die Mobilität von DDB2 und XPC mittels der oben beschriebenen FRAP-Technik. Dazu wurden menschliche Fibroblasten mit einem DDB2-GFP respektive mit einem XPC-GFP-Konstrukt transfiziert und 16 Stunden lang mit 75 μ M Formaldehyd inkubiert. Wir wählten die Konzentration von 75 μ M, da es sich dabei um den physiologischen Blutspiegel handelt (Lehman-McKeeman 2010; Swenberg et al. 2010). Die

Diffusion von DDB2-GFP in unbehandelten Zellen erfolgt rasch und ohne die Bildung einer immobilen Fraktion (Abb. 12A). Die Formaldehydbehandlung führt zu einer signifikanten Verlangsamung des DDB2-GFP Fusionsproteins. Ein Kontrollexperiment mit unkonjugiertem GFP zeigt, dass Formaldehyd keinen Einfluss auf die Mobilität dieses Fluoreszenzproteins hat (Abb. 12B). Um zu untersuchen, ob die Diffusion von DDB2 auch durch andere quervernetzende Substanzen beeinflusst wird, wurden die Fibroblasten anstelle von Formaldehyd mit 5 μ M Cisplatin behandelt (Abb. 12C).

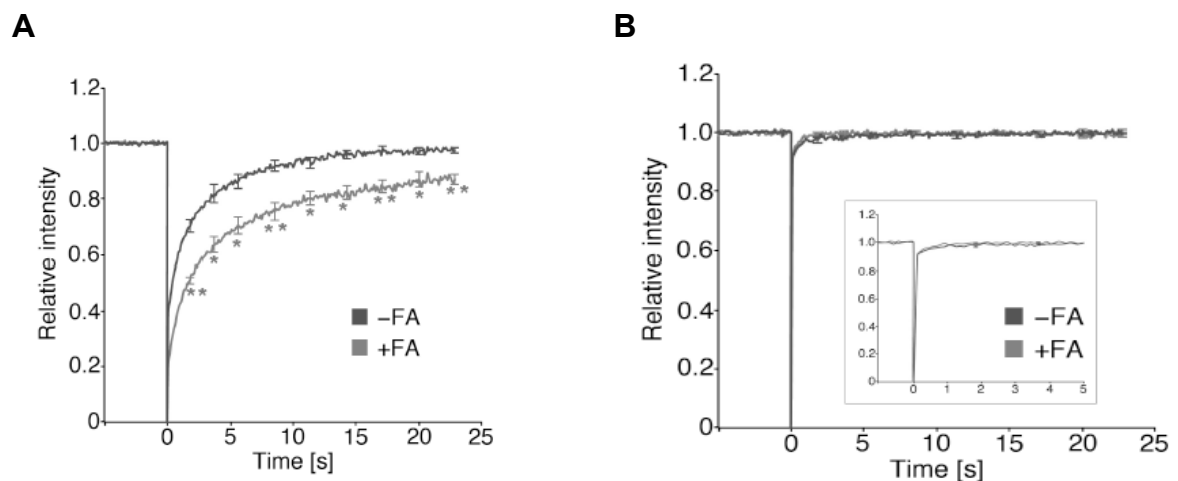


Abb. 12. FRAP-Experimente zur Bestimmung der nukleären Dynamik von DDB2-GFP. (A) Eine Behandlung mit 75 μ M Formaldehyd (+FA) verlangsamt die Bewegungen von DDB2-GFP im Gegensatz zur Kontrolle in unbehandelten Fibroblasten (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$). (B) FRAP-Experimente mit dem alleinigen Fluoreszenzprotein GFP.

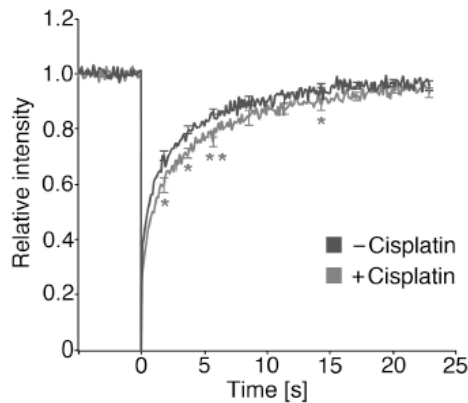
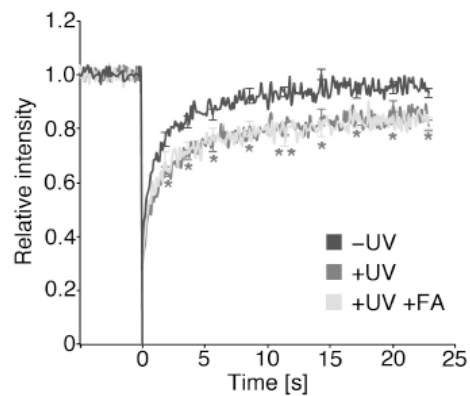
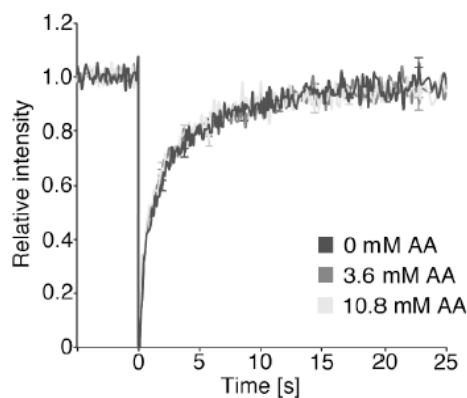
C**D****E**

Abb. 12 (Fortsetzung). (C) Die Behandlung mit Cisplatin bewirkt eine vorübergehende aber signifikante Reduktion der DDB2-Proteinmobilität im Vergleich zum Kontrollprotein in unbehandelten Zellen. (D) Eine UV-Behandlung (+UV) mit 10 J/m^2 und zusätzlicher Formaldehydzugabe von $75 \text{ } \mu\text{M}$ (+FA) reduziert die Mobilität von DDB2-GFP im gleichen Mass wie eine Formaldehydbehandlung alleine. (E) Eine Acetaldehydbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen hat keine Auswirkung auf die Mobilität von DDB2-GFP (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$).

Die übliche zytotoxische Dosis dieses Chemotherapeutikums beträgt $10 \text{ } \mu\text{M}$ Cisplatin (Colton et al. 2006). Da wir aber hier nicht eine letale Dosis anstreben, wurde die Konzentration auf die Hälfte reduziert. Das in der Krebstherapie verwendete Cisplatin induziert Vernetzungen zwischen verschiedenen DNA-Strängen sowie innerhalb der beiden DNA-Stränge (Basu et al. 2010), welche ebenfalls durch den NER-Mechanismus eliminiert werden (Moggs et al. 1996). Mittels FRAP-Experimente können wir belegen, dass Cisplatin kurzfristig zu einer leichten aber signifikanten Abnahme der Mobilität von DDB2 führt. Nach 25 s erreicht die DDB2-GFP-Fluoreszenz in Cisplatin-behandelten Zellen wieder das Niveau der unbehandelten Kontrolle (Abb. 12 C). Die genaue Rolle von DDB2 in der Reparatur von Cisplatin-Addukten ist

jedoch ungewiss (Wittschieben et al. 2005). Es ist bekannt, dass DDB2 mit einer hohen Affinität an UV-geschädigte DNA bindet und somit die Exzision der UV-Schäden stimuliert (Sugasawa 2009).

In der Abb. 12D wurden die Zellen zusätzlich zu Formaldehyd noch mit UV-Licht (10 J/m^2) bestrahlt. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen kommt es dabei zu einer Reduktion der Mobilität von DDB2-GFP durch die Erkennung von UV-Läsionen durch diesen Faktor. Wenn die Fibroblasten noch zusätzlich mit Formaldehyd behandelt werden, nimmt die immobile Fraktion von DDB2 jedoch nicht weiter zu. Die Effekte von Formaldehyd auf die DDB2-Mobilität lassen sich jedoch nicht auf andere Vertreter der Aldehyde extrapolieren: Im Gegensatz zu Formaldehyd führte eine Behandlung der Fibroblasten mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Acetaldehyd (3.6 bzw. 10.8 mM) nicht zu einer verlangsamten Diffusion von DDB2-GFP (Abb. 12E). Wir wählten die Konzentration von 3.6 mM Acetaldehyd, da in einer früheren Veröffentlichung gezeigt werden konnte, dass bei dieser Konzentration bereits DPCs nachzuweisen sind. Bei 10.8 mM Acetaldehyd handelt es sich um das 3-fache der oben beschriebenen Konzentration (Garcia et al. 2009).

Als Beweis, dass die verlangsamte Mobilität von DDB2-GFP in den behandelten Zellen nicht durch Formaldehyd-bedingte Reduktion der DDB2-Proteinexpression zustande kam, führten wir eine Proteinmessung mittels Western-Blot durch. Dabei stellten wir keine verringerte Expression von endogenem DDB2 fest (Abb. 13A). Mit der Quantifikation der Banden und Normalisierung gegen die GAPDH-Kontrolle konnten wir bestätigen, dass die endogene DDB2-Expression nicht von der Formaldehydbehandlung abhängig ist (Abb. 13B).

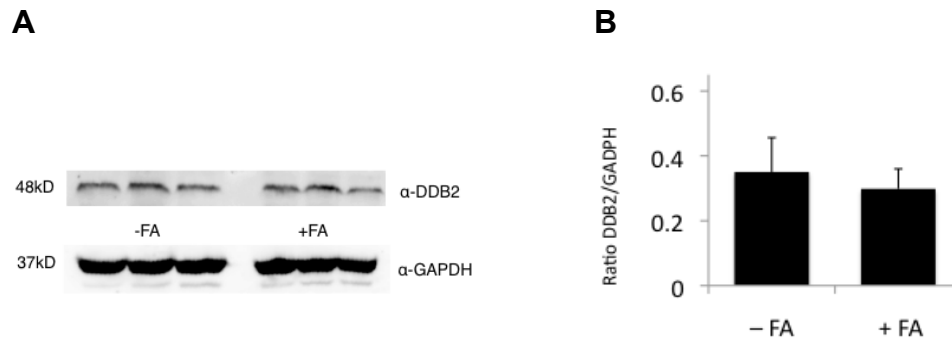


Abb. 13. Endogenes DDB2. (A) Western Blot mit anti-DDB2-Antikörpern und anti-GAPDH-Antikörpern. Die Fibroblasten wurden mit 75 μ M Formaldehyd behandelt. Bei (B) wurde der Western-Blot quantifiziert als Verhältnis zu GAPDH; der resultierende Unterschied ist nicht signifikant, $p = 0.2208$.

4.1.3 Die nukleäre Mobilität von XPC in Abhängigkeit von Formaldehyd

XPC ist ein wichtiger Sensor, der ein äusserst breites Spektrum verschiedener DNA-Schäden erkennt. Dazu gehören UV-Photoprodukte, sperrige DNA-Addukte, DPX, Cisplatin-Addukte und oxidative Schäden (D'Errico et al. 2006; Le May et al. 2010). Während seiner einzigartigen Suche nach Läsionen kombiniert XPC eine hüpfende und eine gleitende Bewegung, um effizient Distanzen zu überbrücken und an Hindernissen vorbeizukommen (Clement et al. 2010). Diese Mobilität untersuchten wir in Fibroblasten, welche für 16 Stunden mit 75 μ M Formaldehyd behandelt wurden (Abb. 14A).

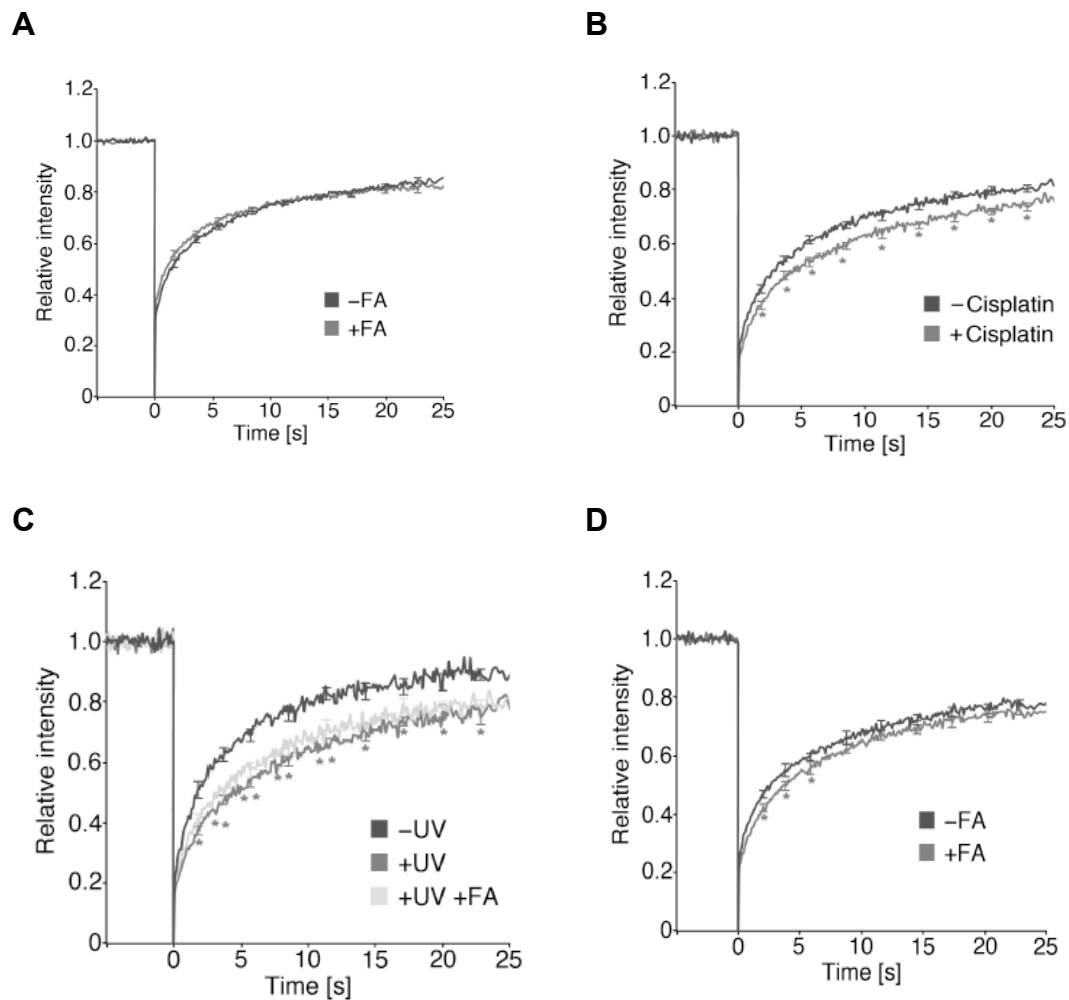


Abb. 14. Nukleäre Proteindynamik von XPC-GFP. Eine Formaldehydbehandlung (A) von 75 μ M (+FA) verändert die Beweglichkeit von XPC-GFP nicht im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (-FA). (B) Die Inkubation mit Cisplatin (+ Cisplatin) reduziert die Mobilität von XPC-GFP im Gegensatz zu den unbehandelten Fibroblasten. (C) Eine UV-Behandlung (+UV) verzögert die Diffusion von XPC-GFP, eine zusätzliche Formaldehydbehandlung (+FA) beeinflusst die Mobilität von XPC-GFP nicht. (D) Durch Überexpression von DDB2-RFP (=rot fluoreszierendes Protein) kann eine Wirkung von Formaldehyd auf die Dynamik von XPC-GFP nachgewiesen werden. Statistische Signifikanz: * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$.

Im Gegensatz zu DDB2-GFP (Abb. 13B) wird die nukleäre Beweglichkeit von XPC-GFP durch Formaldehyd nicht merklich beeinflusst. Eine Schädigung der Zellen mit 5 μ M Cisplatin während 16 Stunden (wie sie bereits für Abb. 12C durchgeführt wurde) verursachte eine signifikante Verminderung der XPC-GFP Mobilität, welche zu einer immobilen Fraktion führte (Abb. 14B). Wie in

der Literatur bekannt (Hoogstraaten et al. 2008), führt eine UV-Bestrahlung (10 J/m^2) der Zellen zu einer Reduktion der mobilen XPC-GFP Fraktion (Abb. 14C). Wurden die Fibroblasten zusätzlich zur UV-Licht-Schädigung noch mit Formaldehyd behandelt, hatte dies keinen vermindernenden Effekt auf die Diffusion von XPC-GFP, sondern begünstigte sogar leicht die Dynamik dieses Proteins in UV-geschädigten Zellen. In der Abb. 14D wurden die Zellen mit DDB2-RFP (red fluorescent protein) und mit XPC-GFP transfiziert. Diese Kotransfektion der Zellen mit zusätzlicher Formaldehydbehandlung führte initial zu einer signifikanten Abnahme der XPC-GFP Mobilität. Somit konnte durch Überexpression von DDB2-RFP doch noch ein Effekt von Formaldehyd auf die Mobilität von XPC-GFP gemessen werden.

4.1.4 Die nukleäre Mobilität von OGG1 und APE1 in Abhängigkeit von Formaldehyd

Der BER-Mechanismus ist für die Elimination von veränderten Basen zuständig. Dabei handelt es sich z.B. um oxidativ geschädigte Basen, aber auch um desaminierte oder alkylierte Basen (Dantzer et al. 2000). Eine der häufigsten DNA-Veränderungen stellt das 8-Oxo-Guanin dar, welches durch freie Sauerstoffradikale hervorgerufen wird (Cooke et al. 2008). Die DNA-Glykosylase OGG1 erkennt die veränderte Basen und schneidet sie aus der DNA-Doppelhelix aus. Durch diesen Vorgang kommt es zu einer Eröffnung der DNA-Struktur und ein zweites Enzym, die Endonuklease APE1 schneidet die verbleibenden Ribose- und Phosphatreste weg (Danzter et al. 2000). Im Rahmen dieser Arbeit haben wir den Einfluss von Formaldehyd auf die Dynamik der beiden Enzyme OGG1 und APE1 untersucht. Um oxidative Schäden zu generieren wurden die mit OGG1-GFP oder APE1-GFP transfizierten Zellen mit 20 mM Kaliumbromat inkubiert (Mangal et al. 2009). Die anschliessenden FRAP-Experimente zeigten, dass Formaldehyd die Mobilität von OGG1-GFP zu Beginn der Erholungszeit signifikant verringert (Abb. 15A). Diese Reduktion der Mobilität ist aber nur temporär und nach 25 Sekunden nicht mehr sichtbar. Die enorm rasche Diffusion (man beachte die Zeitskala in Abb. 15B) der Endonuklease APE1 wird dagegen durch eine Formaldehydbehandlung nicht verändert (Abb. 15B).

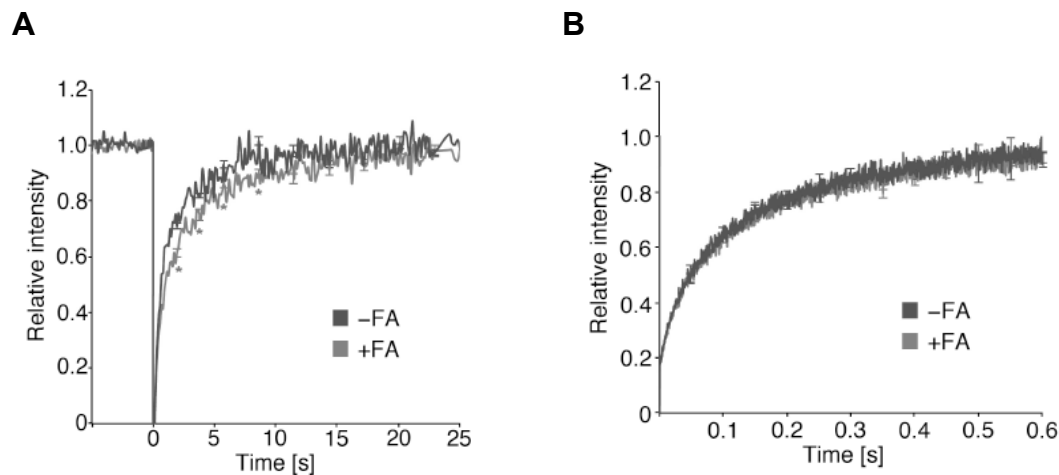


Abb. 15. Formaldehydabhängige Mobilität der beiden ersten Enzymen des BER-Vorganges in Fibroblasten, die mit Kaliumbromat (20 mM) oxidativ geschädigt wurden. (A) Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ist die Diffusion von OGG1-GFP während den ersten Sekunden nach Bleichung signifikant verringert. (B) Formaldehyd (+FA) übt keinen Einfluss auf die Dynamik von APE1-GFP aus. Die kürzere Zeitskala weist auf die sehr hohe Mobilität von APE1-GFP hin (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$).

4.2 Effekt von Formaldehyd auf die Reparatur verschiedener DNA-Schäden

4.2.1 Reparatur-Assay

Durch die Interferenz mit der Rekrutierung von Reparaturfaktoren sowie deren Mobilität erwarteten wir eine Hemmung der Reparaturmechanismen durch Formaldehyd. Diese Hypothese wurde mittels eines „host cell reactivation assays“ getestet, der auf DNA-Reparatur eines geschädigten Reportergens basiert. Die Schädigung des Reportergens kann durch verschiedene Noxen verursacht werden (UV-Strahlung, Cisplatin oder oxidativer Stress). In diesem Assay wird dann die Fähigkeit von Fibroblasten gemessen, diesen geschädigten Vektor zu reparieren. Die erfolgreiche DNA-Reparatur führt schliesslich zur Expression eines Luciferase-Enzyms.

Zuerst werden die Zellen mit dem geschädigten Reportervektor pGL3 sowie dem unbeschädigten Kontrollvektor pRLTK transfiziert. Danach beginnt die Behandlung mit Formaldehyd während 18 Stunden. Schliesslich werden die Zellen für die Bestimmung der Luciferaseaktivität prozessiert. Eine

Verlaufsstudie mit zunehmender Formaldehydkonzentration zeigt auf, dass bereits geringe Mengen Formaldehyd (ab 25 μ M) die Reparatur von UV-Schäden signifikant verringern (Abb. 16A). Eine 50%ige Reduktion der Luciferaseaktivität wird bei einer Konzentration von 100 μ M Formaldehyd erreicht (Abb. 16A). Wie in der Abb. 16B zu sehen ist, konnte der formaldehydbedingte Reparaturdefekt durch eine Überexpression von DDB2 (+DDB2) fast vollständig kompensiert werden. Dieses Ergebnis unterstreicht die Hypothese, dass die Hemmung der Reparatur von UV-Läsionen hauptsächlich über eine Sequestrierung von UV-DDB zu Stande kommt.

Eine Behandlung des Reportervektors mit 4.5 mM Cisplatin führte zur Bildung von DNA-Addukten, welche die Luciferase-Expression verminderten. Bei zusätzlicher Formaldehydbehandlung war die Aktivität der Luciferase nochmals um ca. 50% reduziert (Abb. 16C). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Formaldehyd nicht nur die Entfernung von UV-Läsionen, sondern auch die Reparatur von chemisch induzierten DNA-Addukten beeinträchtigt.

Wird der pGL3-Reportervektor mit Methylenblau vorinkubiert und der Bestrahlung mit einer Wolframdrahtglühbirne unterworfen, entstehen als Folge dieser kombinierten Behandlung 8-Oxo-guanine (Spivak et al. 2006). Die dadurch verursachten oxidativen Schädigungen reduzierten erwartungsgemäss die Luciferaseaktivität in den unbehandelten Zellen. Die zusätzliche Formaldehydbehandlung hatte einen signifikanten Einfluss auf die Reparatur dieses Schadens (Abb. 16 C). Als negative Kontrolle wurden die Fibroblasten (Abb. 16 D) mit einem unbeschädigten pGL3-Vektor transfiziert und mit aufsteigenden Formaldehydkonzentrationen behandelt. Bei diesem Kontrollexperiment wurde keine verminderte Luciferaseexpression beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Beobachtungen in Abb. 16A-C tatsächlich durch eine verminderte Reparaturaktivität bedingt sind.

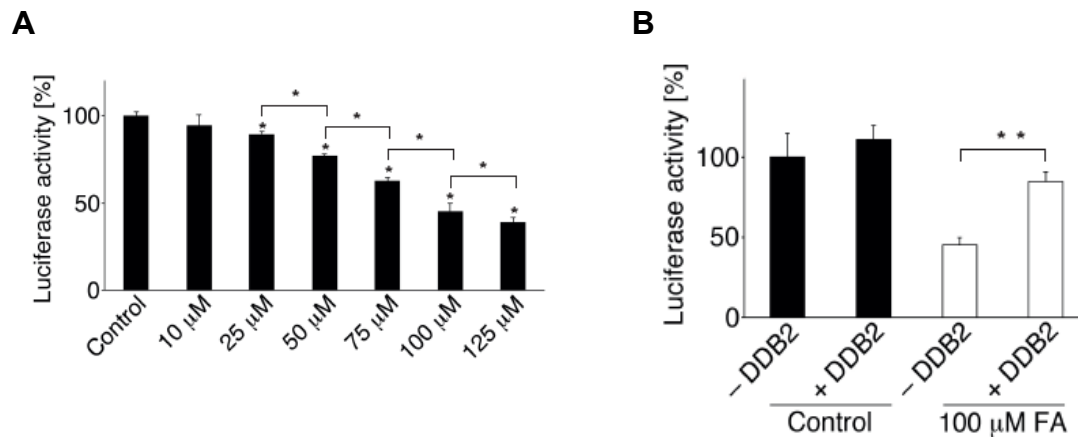


Abb. 16. Wirkung von Formaldehyd auf die NER-Aktivität. (A) Konzentrationsabhängige Reduktion der Luciferaseexpression mit zunehmender Formaldehydkonzentration im Zellkulturmedium. Ab einer Konzentration von 25 μ M Formaldehyd nimmt die Luciferaseaktivität der Fibroblasten, welche mit dem UV-geschädigten pGL3-Vektor transfiziert wurden, signifikant ab. Bei einer Konzentration von 100 μ M Formaldehyd liegt die Luciferaseaktivität bei 50% des Kontrollwertes. (B) Bei einer Formaldehydbehandlung von 100 μ M nimmt die Aktivität auch um 50% ab, sobald aber das Protein DDB2-EGFP zusätzlich exprimiert wird, ist die Reparatur des geschädigten Vektors auf fast 90% der Kontrolle wiederhergestellt.

* $p < 0.05$ ** $p < 0.001$

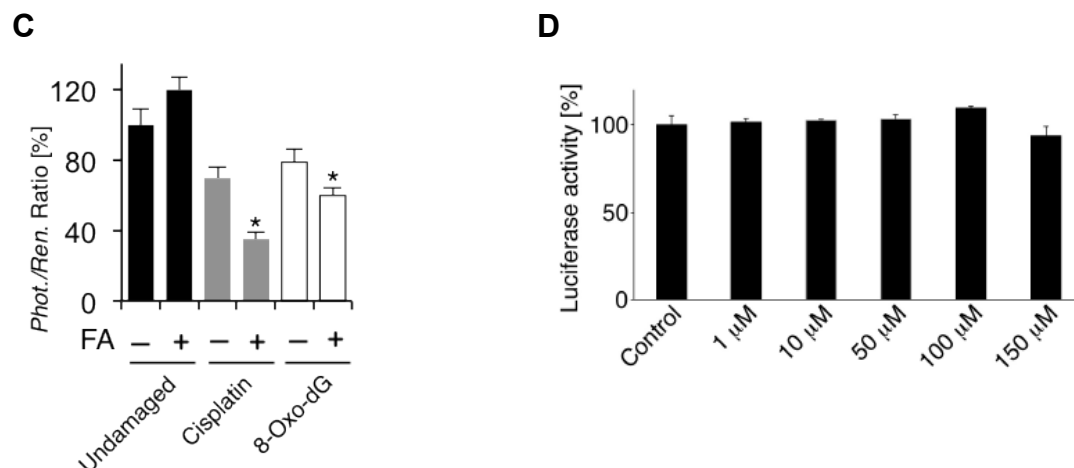


Abb. 16 (Fortsetzung). In (C) wird die Luciferaseaktivität in Zellen gemessen, welche unbeschädigt sind, mit cisplatingeschädigtem Vektor inkubiert wurden oder 8-Oxo-guanine Schäden auf dem Vektorgenom enthalten. Zusätzlich wurde die Hälfte der Fibroblasten noch mit 100 μ M Formaldehyd behandelt.

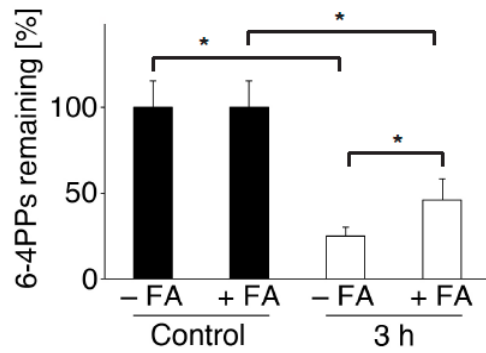
Bei den Fibroblasten, welche keinen geschädigten Vektor haben, konnte keine Reduktion der Luciferaseaktivität beobachtet werden, auch nicht durch eine zusätzliche Formaldehydbehandlung. Durch die Transfektion mit dem cisplatingeschädigten Vektor konnte eine Reduktion der Luciferaseaktivität in den Fibroblasten beobachtet werden. Dieser Effekt wird durch eine zusätzliche Formaldehydbehandlung signifikant verstärkt. Auch kommt es zu einer geringeren Luciferaseaktivität bei der Transfektion von UV-beschädigten Vektoren. Hier ist die Aktivität der Luciferase durch die zusätzliche Behandlung von Formaldehyd signifikant verringert. Die Figur (D) ist unser Kontrollexperiment. Hier wurden die Fibroblasten mit einem nicht geschädigten pGL3-Vektor transfiziert. Eine Formaldehydbehandlung der Zellen mit diesem unbeschädigten Reportervektor zeigt auf, dass Transkription und Translation bei den angegebenen Formaldehydkonzentrationen nicht beeinflusst werden.

** $p < 0.05$ ** $p < 0.001$*

4.2.2 Reparatur von 6-4 Photoprodukten in der chromosomalen DNA

Die UV-Bestrahlung der DNA führt zu zwei Typen von Photoprodukten: den Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPDs) und den (6-4)Pyrimidin-Pyrimidon Photoprodukten (6-4PPs) (Ikehata et al. 2011). Letztere werden ausschliesslich und sehr effizient von XPC erkannt. In einem sogenannten ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) untersuchten wir den Effekt von Formaldehyd auf die Reparatur dieser 6-4PPs drei Stunden nach UV-Bestrahlung der Fibroblasten (Abb. 17A). In diesem Fall enthielten die Zellen keinen geschädigten Reportervektor, sondern wurden direkt mit einer UV-Lampe geschädigt (UV-C; 15 J/m^2). Die DNA wurde aus den Zellen extrahiert und die darin vorhandenen 6-4PPs mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Bei der Kontrolle handelt es sich um Zellen, welche direkt nach der Bestrahlung eingesammelt wurden und deshalb keine Zeit hatten, die 6-4 Photoprodukte zu reparieren. Die Menge an 6-4PPs in diesen bestrahlten Zellen ohne Reparaturinkubation wurde auf 100% gesetzt. Werden die Fibroblasten erst 3 Stunden nach der Bestrahlung eingesammelt, wurden ungefähr 70% der 6-4PPs vom NER-Mechanismus eliminiert. Durch die zusätzliche Formaldehydbehandlung werden jedoch nur noch 50% des Schadens repariert.

A (Formaldehyd)



Figur 17. Der Effekt der Formaldehydbehandlung auf die Reparatur von 6-4 Photoprodukten. Die totale Menge der 6-4 Photoprodukte ist auf 100 % gesetzt. Bei den formaldehydbehandelten Zellen verbleibt nach 3 Stunden eine grössere Anzahl der 6-4 Photoprodukten * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$.

5. Diskussion

Die Grundhypothese dieser Dissertation lautete, dass Formaldehyd Quervernetzungen zwischen der DNA und Zellproteinen verursacht und dass diese Vernetzungen den Mechanismus der NER und BER negativ beeinflussen könnten. Die Folge dieser Beeinträchtigung der DNA-Reparatur ist, dass DNA-Schäden verzögert eliminiert werden und dadurch ein Reparaturdefekt zu beobachten ist.

Auf Grund dieser Hypothese haben wir die Auswirkung der quervernetzenden Substanz Formaldehyd auf die Mobilität der beiden wichtigen DNA-Reparaturproteine DDB2 und XPC (Clement et al. 2010; Sugasawa 2009) als fluoreszierende Fusionsprodukte in lebenden menschlichen Zellen untersucht. Mit entsprechenden Reparaturtests haben wir ferner die NER- und BER-Aktivität in der Gegenwart unterschiedlicher DNA-Schäden (UV-Läsionen, DNA-Addukte, oxidierte Basen) geprüft.

5.1 Formaldehyd und UV-Licht

Da Formaldehyd in ganz unterschiedlichen Bereichen angewendet wird, kommt man im normalen Alltag oft mit dieser Substanz in Kontakt. Man trifft Formaldehyd in Kosmetikprodukten als Konservierungsmittel an, aber auch in Textilien, Spanplatten oder Teppichen ist Formaldehyd ein wichtiges Bindemittel. Ein grosses Problem von Formaldehyd besteht darin, dass es oft über Jahre unbemerkt abgegeben wird und dadurch vor allem eine chronische Bedrohung darstellt. Da Formaldehyd in kosmetischen Produkten oft allergische Reaktionen auslösen kann, werden immer mehr formaldehyd-freisetzende Stoffe verwendet. Diese Stoffe geben Formaldehyd kontinuierlich unter bestimmten Bedingungen ab. Erlaubt sind maximal 0.2% ungebundenes Formaldehyd in Kosmetika (Kireche et al. 2010). Formaldehyd kann einfach durch die Haut aufgenommen werden. In einer Studie wurde 4 Stunden nach Formaldehyd-Applikation 65% der aufgetragenen Menge in der Haut nachgewiesen (Robbins et al. 1984). Eine andere ständige Bedrohung für unsere Haut stellt das UV-Licht dar. UV-B und UV-A Strahlen erreichen die

äusseren Hautschichten (Mouret et al. 2006) und verursachen die zwei häufigsten Veränderungen der DNA, nämlich Cyclobutan-Dimere (CPD) und 6-4 Photoprodukte (6-4PP). Diese DNA-Schäden werden durch den NER-Mechanismus eliminiert (Sugasawa 2009), wobei die globale Genomreparatur (GGR) den grössten Anteil an der Reparatur dieser Läsionen leistet (Satoh et al. 1993). Das DDB2 Protein stellt einen wichtigen Faktor im NER-Mechanismus dar und bildet zusammen mit dem Protein DDB1 eine Untereinheit vom UV-DDB-Komplex, welche mit grosser Affinität an UV-geschädigte sowie, mit geringerer Affinität, an Cisplatin-veränderte DNA bindet (Shiyanov et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von DDB2 die NER fördert und aus dieser Tatsache lässt sich schliessen, dass DDB2 somit auch vor UV-Schädigungen schützt (Sun et al. 2010).

5.2 Wirkung von Formaldehyd auf DDB2

In Kapitel 4.1.2 wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit Formaldehyd, aber auch mit Cisplatin oder UV eine Reduktion der Mobilität von DDB2-GFP verursacht. Cisplatin und UV induzieren hauptsächlich DNA-Addukte (Basu et al. 2010). Werden die Zellen mit Cisplatin oder UV beschädigt, ist die nukleäre Mobilität von DDB2-GFP vermindert, weil es die Cisplatinaddukte oder UV-Läsionen erkennt und daher mit der DNA interagiert.

Durch Formaldehyd und kommt es vorwiegend zu Vernetzungen von Proteinen – grösstenteils Histonen - mit der DNA-Doppelhelix (Quievryn 2000; Speit 2000; Moggs 1996; Solomon 1985). Offenbar ist die nukleäre Diffusionsfähigkeit von DDB2-GFP durch diese kovalente Anlagerung von Histonproteinen an der DNA verringert. Darum ist das DDB2-GFP nicht mehr so mobil wie ohne Formaldehydbehandlung. Abb. 12D zeigt, dass die Mobilität von DDB2-GFP nicht verändert wird, wenn die Zellen noch zusätzlich mit UV bestrahlt werden, obwohl die dabei entstehenden UV-Läsionen das präferentielle Bindungssubstrat für DDB2 darstellt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Formaldehydschäden die Beweglichkeit von DDB2-GFP schon so stark beeinträchtigen, dass die UV-induzierten Schäden nur noch ungenügend detektiert werden können. Wichtig ist, dass Formaldehyd keinen

Einfluss auf die Proteinexpression von DDB2 hat (Abb. 13), so dass der Unterschied in der Proteinmobilität nicht durch unterschiedliche Proteinkonzentrationen bzw. -gradienten zustande kommt.

Ein Kontrollexperiment mit der ebenfalls quervernetzenden Substanz Acetaldehyd (Garcia et al. 2009) zeigt uns in Abb. 12E auf, dass diese Effekte spezifisch für Formaldehyd sind und die Mobilität von DDB2-GFP durch andere Aldehyde nicht beeinflusst werden. Somit muss angenommen werden, dass die DDB2-GFP Mobilität durch die verschiedenen Acetaldehyd-Addukte, wegen der unterschiedlichen Addukt-Grösse oder der Lage der entstandenen Quervernetzungen nicht beeinflusst wird.

5.3 Wirkung von Formaldehyd auf XPC

Das XPC-Protein ist der Initiator des NER-Mechanismus, der ein äusserst breites Spektrum verschiedener DNA-Schäden, wie zum Beispiel UV-Photoprodukte, DNA-Addukte und bestimmte oxidative Schäden erkennen kann. Nur für die Detektion von UV-induzierten Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer ist XPC auf die Hilfe von UV-DDB angewiesen (Fitch et al. 2003). Aufgrund seines einzigartigen Suchmodus (Clement et al. 2010) interagiert das XPC-Protein intensiv mit der unbeschädigten DNA. Dies zeigt sich im Auftreten einer immobilisierten Fraktion von XPC-GFP schon in unbehandelten Zellen. Diese Proteinmobilität wird durch eine Behandlung mit 75 μ M Formaldehyd nicht mehr beeinflusst, was in Abb. 14A illustriert wird.

Auch für die Elimination der Cisplatin-Addukte ist der NER-Mechanismus zuständig (Moggs et al. 1996). Auffallend bei der Zell-Inkubation mit 5 μ M Cisplatin ist, dass die immobile Fraktion von XPC-GFP durch die Cisplatinbehandlung signifikant vergrössert wird. Der Unterschied zur Mobilität von DDB2-GFP mit 5 μ M Cisplatin ist damit zu erklären, dass XPC auch den initialen Erkennungsfaktor für Cisplatin-Addukte darstellt (Chen et al. 2003; Moggs et al. 1996). Die Bindung von XPC-GFP an die Cisplatin-geschädigte DNA der Zellen führt zur Reduktion seiner nukleären Beweglichkeit (Abb. 14B).

Aus dem gleichen Grund ist die Mobilität von XPC-GFP nach UV-Bestrahlung deutlich vermindert. Dies widerspiegelt die hohe Affinität von XPC für 6-4

Photoprodukte (Sugasawa et al. 2005). Eine zusätzliche Behandlung mit Formaldehyd (Abb. 14C) erhöht die Mobilität von XPC-GFP im Vergleich zur alleinigen UV-Behandlung nicht. Auch dieses Ergebnis könnte so gedeutet werden, dass die Formaldehyd-Effekte auf das Chromatin die Erkennungsfunktion des XPC-Proteins beeinträchtigen und somit die Interaktion mit UV-beschädigter DNA vermindern. Interessanterweise führt eine gleichzeitige Überexpression von DDB2-RFP (Abb. 14D) zu einer reduzierten Mobilität von XPC-GFP in den mit 75 μ M Formaldehyd behandelten Zellen. Hier wird DDB2-RFP durch die DPXs in seinen Bewegungen behindert. Wenn nun XPC molekulare Wechselwirkungen mit UV-DDB eingeht und mit diesem Faktor Komplexe bildet (Sugasawa et al. 2005), so führt eine Einschränkung der Beweglichkeit von UV-DDB auch zu einer Beeinträchtigung der Suchfunktion von XPC, das dadurch nicht an die geschädigte Stelle gelangen kann. Somit lässt sich erklären, dass XPC-GFP unter einer Überexpression von DDB2-RFP und in der Gegenwart von Formaldehyd weniger mobil wird.

5.4 Wirkung von Formaldehyd auf BER-Enzyme

Veränderte (oxidierte, desaminierte oder alkylierte) Basen werden vorwiegend durch den BER-Mechanismus eliminiert (Friedberg et al. 2006; Dantzer et al. 2000). Dieser Reparaturmechanismus wird mit der Erkennung der veränderten Base durch eine DNA-Glykosylase (z.B. OGG1) ausgelöst (Dantzer et al. 2000). In unserem Zellsystem wurden Oxidationsschäden der DNA durch eine Behandlung mit 20 mM Kaliumbromat (KBrO_3) erzeugt (Mangal et al. 2008). Unter diesen Bedingungen konnten wir beobachten, dass eine Zugabe von 75 μ M Formaldehyd die Mobilität von OGG1-GFP während den ersten 10 Sekunden der Erholungsphase im FRAP-Experiment verlangsamt (Abb. 15A).

Nach der Exzision der veränderten Base schreitet die BER so fort, dass eine Endonuklease (genannt APE1) den verbleibenden Ribose- und Phosphatrest aus der DNA-Doppelhelix herausschneidet. Das in unserer Studie geprüfte APE1-GFP zeichnet sich durch eine ausgesprochen hohe Diffusionsrate aus. Ferner wurde die hohe Mobilität dieses APE1-Konstruktes durch eine

Behandlung mit Formaldehyd nicht verändert. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass verschiedene Schritte eines Reparaturprozesses unterschiedlich von Formaldehyd betroffen sein könnten. Trotzdem liess die Verringerung der nukleären Mobilität des initialen Sensors von oxidativen Schäden, OGG1, vermuten, dass der angemessene Ablauf der BER durch Formaldehyd gestört sein könnte. Durch diese Störungen des Reparaturmechanismus kann es zu einer Fehlpaarung kommen und somit auch zu Mutationen mit Funktionsverlust der codierten Proteine.

5.5 Messung von Reparaturaktivitäten

Mit dem „Host-cell reactivation“-Assay wurde die Reparatur eines geschädigten Luciferase-Reportergens gemessen (Figur 16). Hierbei wurde der Reportervektor pGL3 durch eine UV-C-Lampe (1000 J/m^2) geschädigt und mittels Transfektion in menschliche Fibroblasten eingeschleust, welche mit Formaldehyd behandelt wurden.

Ab einer Konzentration von $25 \text{ } \mu\text{M}$ Formaldehyd ist die Luciferaseaktivität signifikant erniedrigt, was auf eine verminderte Nukleotid-Exzisionsreparatur-Aktivität deutet. Hinweise auf eine solche Hemmung der Reparaturaktivität gab es schon auf Grund eines früheren Berichtes von Emri et al. (2004). Darin zeigten die Autoren, dass bereits eine geringe Konzentration ($25 \text{ } \mu\text{M}$) Formaldehyd fähig ist, die Bildung von DNA-Strangbrüchen nach UV-Bestrahlung zu verzögern. DNA-Strangbrüche entstehen unter anderem vorübergehend als Zwischenschritt der DNA-Exzisionsreparatur. Somit wurde dieses Ergebnis dahingehend interpretiert, dass Formaldehyd schon im tiefen Dosisbereich den NER-Vorgang beeinträchtigt. Allerdings fehlte ein direkter Beleg über den Mechanismus dieser Hemmung. Dies ist erstaunlich, da die Blutkonzentration von Formaldehyd ungefähr $100 \text{ } \mu\text{M}$ beträgt (Lehmann 2010; Swenberg et al. 2010). Formaldehyd ist aber auch in allen anderen Zellen, Geweben und Körperflüssigkeiten anzutreffen. In einem Bericht von Schmid und Speit (2007) wird es als bewiesen angesehen, dass die endogene Formaldehydkonzentration DPX in Blutzellen verursachen können. Die entstandenen Quervernetzungen konnten aber während einer gewissen Zeit wieder eliminiert werden. Sie beobachteten, dass es ab einer Konzentration

von 200 μM zu persistierenden Crosslinks kam, die bis zur verbleibenden Replikation präsent blieben (Schmid et al. 2007). Wie hoch die Konzentration von Formaldehyd in anderen Geweben ist, konnte bisher nicht eruiert werden. Im „Host-cell reactivation“-Assay führte die Behandlung mit 100 μM Formaldehyd zur einer 50%igen Reduktion der Reparaturaktivität (16A). Durch die zusätzliche Überexpression von DDB2 wird diese Hemmung der DNA-Reparatur fast aufgehoben (16B). Dieser Befund kann mit der Beobachtung in Verbindung gebracht werden, dass Formaldehyd die Suchfunktion von DDB2 nach DNA-Schäden behindert. Dies erfolgt indirekt über eine Einschränkung der Beweglichkeit dieses Faktors im Zellkern. Den negativen Einfluss von Formaldehyd auf die Schadenserkennungs-Aktivität von DDB2 kann durch eine Erhöhung der zellulären Konzentration dieses Faktors wieder teilweise aufgehoben werden. Damit steht wieder genügend DDB2 zur Verfügung, welches trotz eingeschränkter Mobilität die DNA-Schäden genügend schnell erkennen und der DNA-Reparatur zuführen kann.

In der Abb. 16C wurde der Reportervektor pGL3 mit Cisplatin beschädigt (durch Inkubation mit 4.5 mM Cisplatin). Der Cisplatin-geschädigte Vektor wurde in die Fibroblasten eingeschleust und die Zellen zusätzlich in 100 μM Formaldehyd kultiviert. Nach der Transfektion mit dem geschädigten pGL3-Vektor und einer Behandlung mit 100 μM Formaldehyd verringerte sich die Luciferaseaktivität um etwa 50% im Vergleich zu den Kontrollzellen, die ohne Formaldehyd inkubiert wurden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Formaldehyd im tiefen Dosisbereich auch die Exzision von chemischen Basenaddukten behindert.

Schliesslich wurden dem Reportervektor auch oxidative Basenschädigungen zugefügt, um die Wirkung von Formaldehyd auf die BER zu prüfen. Zu diesem Zweck wurden die Plasmide mit einer Wolframglühbirne in der Gegenwart von Methylenblau bestrahlt. Die transfizierten Zellen wurden mit Formaldehyd inkubiert, was zu einer kleinen aber signifikanten Verminderung der Luciferaseexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrollzellen führte (Abb.16C). Daraus lässt sich schliessen, dass die geringfügige Reduktion der Mobilität von OGG1 bei den FRAP-Experimenten (Abb.15A) einen messbaren Einfluss auf die Reparaturkapazität des BER-Mechanismus ausübt.

Um die hemmende Aktivität von Formaldehyd auf die DNA-Reparatur weiter zu belegen, wurde auch die Exzision eines repräsentativen Schadens aus der chromosomalen DNA von menschlichen Zellen geprüft. Dazu wurde die Elimination von 6-4 Photoprodukten in einem immunologischen Verfahren gemessen (Abb.17A). Dieser UV-Schaden wird durch den NER-Mechanismus herausgeschnitten und tatsächlich konnten wir feststellen, dass die Reparatur dieser UV-Läsion durch eine Formaldehydbehandlung gehemmt wird. Somit zeigt unsere Arbeit, dass die DNA-Protein-Vernetzungen in formalin-behandelten Zellen die DNA-Reparatur beeinträchtigen.

5.6 Schlussfolgerung

Mit verschiedenen Experimenten (FRAP, „Host-cell reactivation“, Exzisions-Assays) konnte aufgezeigt werden, dass Formaldehyd einen hemmenden Einfluss auf die Reparatur verschiedener DNA-Schäden ausübt, welche durch den NER-Mechanismus eliminiert werden. Im „Host-cell reactivation“-Assay ist schon eine Reduktion der Schadensreparatur ab 25 μM Formaldehyd zu beobachten. Bei einer relativen niedrigen Dosis Formaldehyd (100 μM) wurde schon eine Reduktion von 50% der Reparaturkapazität beobachtet. Man erinnere sich an die Tatsache, dass die endogene Formaldehydkonzentration ca. 100 μM beträgt. Auch ist die Eliminierung der 6-4 Photoprodukte um die Hälfte verringert bei einer Formaldehydkonzentration von 75 μM . Die Mobilität eines wichtigen Erkennungsproteins im BER-Mechanismus, OGG1, ist ebenfalls reduziert, so dass die Reparatur von oxidativen Schäden durch eine Formaldehydinkubation leicht verzögert wird. Diese neuen Erkenntnisse weisen alle darauf hin, dass verschiedene DNA-Schäden (UV-Photoprodukte, sperrige DNA-Addukte, oxidierte Basen) durch gleichzeitige Formaldehyd-Exposition schlechter repariert werden. Erstaunlich ist auch die Tatsache, dass es sich hierbei um eher tiefe Formaldehydkonzentrationen handelt und die Auswirkungen doch erheblich sind. Das Auftreten von DPX behindert die wichtigen Reparaturproteine in ihrer effektiven Suche nach DNA-Schäden und somit kann nur ein geringerer Anteil der Schäden erkannt und repariert werden. Daher sollte der direkte Kontakt mit Formaldehyd in Kombination mit UV-Strahlen oder karzinogenen Chemikalien, vermieden werden. Es handelt

sich hierbei um ein erhöhtes Risiko an Hautkrebs zu erkranken. Schon das alleinige Sonnenlicht birgt Gefahren. Bekannt ist, dass eine alleinige UV-Exposition die epidermale Permeabilität schwächt. Das Widerstandvermögen der obersten Hautschicht (Stratum corneum) wird durch eine UV-Exposition verschlechtert und verliert somit auch ihre Schutzfunktion. Wie sich diese Veränderungen auswirken, hängt stark von der Dosis der Exposition ab (Liu et al. 2010). Es ist wichtig unsere Haut so gut wie möglich zu schützen und sie nicht unnötig zusätzlichen Formaldehydquellen (z.B. Textilien, Polstermöbeln, Holzspielzeuge und kosmetischen Produkten) auszusetzen.

6. Referenzen

- Andersen, I., Lundqvist, G. R., Mølhave, L. (1975). Indoor air pollution due to chipboard used as a construction material. *Atmospheric Environment* 9: 1121-1127.
- Afaq, F. (2011). Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 508: 144-151.
- Andressoo, J. O., Hoeijmakers, J. H. (2005) Transcription-coupled repair and premature ageing. *Mutation Research* 577: 179-194.
- Armstrong, B. K., Krickler, A. (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 63: 8-18.
- Arundel, A. V., Sterling, E. M. et al. (1986). Indirect health effects of relative humidity in indoor environments. *Environmental Health Perspectives* 65: 351-361.
- Baron, J. M., Skazik, C. (2010). Research in practice: the second barrier of the human skin. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 8: 155-158.
- Basu, A., Krishnamurthy, S. (2010). Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. Review Article, *Journal of Nucleic Acids*, Article ID 201367.
- Baute, J., Depicker, A. (2008). Base excision repair and its role in maintaining genome stability. *Crit Rev. Biochemistry Molecular Biology* 43: 239-276.
- Bosetti, C., McLaughlin, J. K. et al. (2008). Formaldehyde and cancer risk: a quantitative review of cohort studies through 2006. *Annals of Oncology* 19: 29-43.
- Brash, D. E., Rudolph, J. A. et al (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 10124-10128.
- Camenisch, U., Dip, R. et al. (2006). Recognition of helical kinks by xeroderma pigmentosum group A protein triggers DNA excision repair. *Nature structural & molecular biology* 13: 278-284.
- Cardarelli, F., Bizzarri, R., Serresi, M. et al. (2009). Probing nuclear localization signal-importing alpha binding equilibria in living cells. *Journal Biological Chemistry* 284: 36638-36646.
- Chen, Z., Xu, X. S. et al. (2003). Defining the function of XPC protein in psoralen and cisplatin-mediated DNA repair and mutagenesis. *Carcinogenesis* 6: 1111-1121.

Chu, G. (1994). Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 787-790.

Clement, F. C., Camenisch, U. et al. (2010). Dynamic two-stage mechanism of versatile DNA damage recognition by xeroderma pigmentosum group C protein. *Mutation Research* 685: 21-28.

Cohen-Hubal, E. A., Schlosser, P. M. et al. (1997). Comparison of inhaled formaldehyde dosimetry predictions with DNA-protein cross-links measurements in the rat nasal passages. *Toxicology and Applied Pharmacology* 143: 47-55.

Colton, S. L., Xu, X. S. et al. (2006). The involvement of ataxia-telangiectasia mutated protein activation in nucleotide excision repair-facilitated cell survival with cisplatin treatment. *Biological Chemistry* 287: 27117-27125.

Cooke, M. S., Olinski, R. et al. (2008). Measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesions in urine. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 17: 3-14.

Dantzer, F., de la Rubia, G. et al. (2000). Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* 39: 7559-7569.

D'Errico, M., Parlanti, E. et al. (2006). New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damages. *The EMBO Journal* 25: 4305-4315.

De Graaf, B. et al. (2009). Cellular pathways for DNA repair and damage tolerance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks. *DNA repair* 8: 1207-1214.

De Groot, A. C., Bruynzeel, D. P. et al. (1988). The allergens in cosmetics. *Archives of Dermatology* 124: 1524-1529.

De Groot, A. C., Veenstra, M. (2010). Formaldehyde-releasers in cosmetics in the USA and in Europe. *Contact Dermatitis* 62: 221-224.

De Laat, W. L. et al. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. Review, *Genes & Development* 13: 768-785.

Doi, T., Kajimura, K. et al. (2010). Survey of Formaldehyde (FA) concentration in cosmetics containing FA-donor preservatives. *Journal of Health Science* 56: 116-122.

Edidin, M., Zagayansky, Y. et al. (1976). Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science* 191: 466-468.

Emri, G., Schaefer, D. et al. (2004). Low concentrations of formaldehyde induce DNA damage and delay DNA repair after UV irradiation in human skin cells. *Experimental Dermatology* 13: 305-315.

Fitch, M. E., Nakajima, S. et al. (2003). In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *Journal of Biological Chemistry* 278: 46906-46910.

Flyholm, M. A., Andersen, P. (1993). Identification of formaldehyde releasers and occurrence of formaldehyde and formaldehyde releasers in registered chemicals products. *American Journal of Industrial Medicine* 24: 533-552.

Friedberg, E. C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D. et al. (2006). *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington D.C.

Garcia, C. L., Mechilli, M., Proietti De Santis, L. et al. (2009). Relationship between DNA lesions, DNA repair and chromosomal damage induced by acetaldehyde. *Mutation Research* 662: 3-9.

Godish, T. (1989). Formaldehyde exposures from tobacco smoke: a review. *American Journal of Public Health* 79: 1044-1045.

Gonzaga, E. R. (2009). Role of UV light in photodamage, skin aging, and skin cancer; importance of photoprotection. *American Journal of Clinical Dermatology* 10: 19-24.

Guo, R., Ren. J. (2010). Alcohol and acetaldehyde in public health: from marvel to menace. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7: 1285-1301.

Hoeijmakers, J. H. (2009). DNA damage, aging and cancer. *The New England Journal of Medicine* 361: 1475-1485.

Hoogstraten, D., Bergink, S. et al. (2008). Versatile DNA damage detection by the global genome nucleotide excision repair protein XPC. *Journal of Cell Science* 121: 2850-2859.

IARC (1995) monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Wood dust and formaldehyde. Vol. 62. Lyon: International Agency for Research on Cancer 1995.

IARC (2006) monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Formaldehyde, 2-butoxyethanol, and 1-tert-butoxypropan-2-ol. Vol. 88 Lyon: International Agency for Research on Cancer 2006.

Iftode, C., Daniely, Y., et al. (1999). Replication protein A (RPA): The eucaryotic SSB. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 34: 141-180.

Ikehata, H., Ono, T. (2011). The mechanisms of UV mutagenesis. *Journal of Radiation Research* 52: 115-125.

Iversen, O. H. (1986). Formaldehyde and skin carcinogenesis. *Environment International* 12: 541-544.

Ke, D., Mateos, M. et al. (1993). Regulation of fermentative metabolism in fruits and vegetables by controlled atmospheres. *Proceedings from the sixth international controlled Atmosphere Research Conference, NRAES-71, Cornell University, Ithaca, NY*: 63-77.

Kerns, W. D., Pavkov, K. L. et al. (1983). Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Research* 43: 4382-4392.

Kireche, M. et al. (2010). Preservatives in cosmetics: reactivity of allergenic formaldehyde-releasers towards amino acids through breakdown products other than formaldehyde. *Contact Dermatitis* 63: 192-202.

Krokan, H. E., Nilsen, H. et al. (2000). Base excision repair of DNA in mammalian cells. Minireview, *FEBS Letters* 476: 73-77.

Lachenmeier, D. W., Dierolf-Emig, B. et al (2008). Acetaldehyd: Aromastoff oder karzinogener Kontaminant in alkoholhaltigen Getränken? Conference Presentation, 2008, in Kaiserslautern, Germany. PUB-ID: 103-443-727.

Lehman, I. R. (1974). DNA-Ligase: Structure, mechanism, and function. *Science* 186: 790-797.

Lehman-McKeeman, L. (2010). Paracelsus and formaldehyde 2010: The dose to the target organ makes the poison. *Toxicological Sciences* 116: 361-363.

Le May, N., Egly, J. M., Coin, F. (2010). True lies: the double life of nucleotide excision repair factors in transcription and DNA repair. *Journal of Nucleic Acids*, Article ID 616342.

Li, F., Liu, P. et al. (2010). Genotoxicity/mutagenicity of formaldehyde revealed by the *Arabidopsis thaliana* plants transgenic for homologous recombination substrates. *Mutation Research* 699: 35-43.

Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715.

Liu, Z., Fluhr, J. W. et al. (2010). Sun-induced changes in stratum corneum function are gender and dose dependent in a Chinese Population. *Skin Pharmacology and Physiology* 23: 313-319.

Lundov, M. D., Johansen, J. D. et al. (2010). Formaldehyde exposure patterns of concomitant contact allergy to formaldehyde and formaldehyde-releasers. *Contact Dermatitis* 63: 31-36.

Ma, T. H., Harris, M. M. (1988). Review of the genotoxicity of formaldehyde. *Mutation Research* 196: 37-59.

Maillard, O., Solymon, S., Naegeli, H. (2007). An aromatic sensor with aversion to damaged strands confers versatility to DNA repair. *PLoS Biology* 5: e79.

Mangal, D., Vudathala, D. et al. (2009). Analysis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology* 22: 788-797.

Marsh, G. M., Youk, A. O. et al. (2007). Work in the metal industry and nasopharyngeal cancer mortality among formaldehyde-exposed workers. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 48: 308-319.

Maynard, S., Schurmann, S. H., Harboe, C. et al. (2009). Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 30: 2-10.

Merk, H. F., Baron, J. M. et al. (2006). Concepts in molecular dermatotoxicology. *Experimental Dermatology* 15: 692-704.

Minko, I. G., Zou, Y. et al. (2002). Incision of DNA-protein crosslinks by UvrABC nuclease suggests a potential repair pathway involving nucleotide excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 1905-1909.

Moggs, J. G., Yarema, K. J. et al. (1996). Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intranstrand d(GpTpG)-cisplatin adduct. *Journal of Biological Chemistry* 271: 7177-7186.

Monticello, T. M., Swenberg, J. A., Gross, E. A. et al. (1996). Correlation of regional and nonlinear formaldehyde-induced nasal cancer with proliferating population of cells. *Cancer Research* 56: 1012-1022.

Mouret, S., Baudouin, C. et al. (2006). Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 13765-13770.

Mutsuga, M., Tojima, T. et al. (2005). Survey of formaldehyde, acetaldehyde and oligomers in polyethylene terephthalate food-packaging materials. *Food Additives Contaminants* 22: 783-789.

Nijssen, B., Kamperman, T. et al. (1996). Acetaldehyde in mineral water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles. Odour threshold and quantification. *Packaging Technology and Science* 9: 175-185.

Noda, T., Takahashi, A., Kondo, N. et al. (2011). Repair pathways independent of the Fanconi anemia nuclear core complex play a predominant

role in mitigating formaldehyde-induced DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404: 206-210.

O'Connor, P. M., Fox, B. W. (1989). Isolation and characterization of proteins cross-linked to DNA by the antitumor agent methylene dimethanesulfonate and its hydrolytic product formaldehyde. *Journal of Biological Chemistry* 264: 6391-6397.

Pesis, E., Dvir, O. et al. (2002). Production of acetaldehyde and ethanol during maturation and modified atmosphere storage of litchi fruit. *Postharvest Biology and Technology* 26: 157-165.

Pickrell, J. A., Mokler, B. V. et al. (1983). Formaldehyde release rate coefficients from selected consumer products. *Environmental Science and Technology* 17: 753-757.

Quievryn, G., Zhitkovich A. (2000). Loss of DNA-protein crosslinks from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteasome function. *Carcinogenesis* 21: 1573-1580.

Reardon, J. T., Sancar, A. et al. (2006). Repair of DNA-polypeptide crosslinks by human excision nuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103: 4056-4061.

Recio, L., Sisk, S. et al. (1992). P53 mutations in formaldehyde-induce nasal squamous carcinomas in rats. *Cancer Research* 52: 6113-6116.

Reits, E. A., Neefjes, J. J. (2001). From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nature Cell Biology*, 3: 145-147.

Ridpath, J. R., Nakamura, A. et al. (2007). Cells deficient in the FANC/BRCA pathway are hypersensitive to plasma levels of formaldehyde. *Cancer Research* 67: 11117-11122.

Robbins, J. D. et al. (1984). Bioavailability in rabbits of formaldehyde from durable-press textiles. *Toxicology Environmental Health* 14: 453-463.

Rumchev, K. B., Spickett, J. T. et al. (2002). Domestic exposure to formaldehyde significantly increases the risk of asthma in young children. *European Respiratory Journal* 20: 403-408.

Sainio, E.- L., Engström, K. et al. (2006). Allergenic ingredients in nail polishes. *Contact Dermatitis* 37: 155-162.

Saldivar, S. J., Wu, X. et al. (2007). Nucleotide excision repair pathway review I: Implications in ovarian cancer and platinum sensitivity. *Gynecologic Oncology* 107: 56-71.

Sanath, R. et al. (2004). Detection of formaldehyde in textiles by chromatropic acid method. *Indian Journal of Dermatology* 70: 342-344.

Satoh, M. S., Jones, C. J. et al. (1993). DNA excision-repair defect of xeroderma pigmentosum prevents removal of a class of oxygen free radical-induced base lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6335-6339.

Schmid, O., Speit, G. (2007). Genotoxic effects induced by formaldehyde in human blood and implications for the interpretation of biomonitoring studies. *Mutagenesis* 22: 69-74.

Setshedi, M., Wands, J. R. et al. (2010). Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3: 178-185.

Shiyanov, P., Nag, A. et al. (1999). Cullin 4A associates with the UV-damaged DNA-binding protein DDB. *Journal of Biological Chemistry* 274: 35309-35312.

Slodownik, D., Williams, J. et al. (2011). Textile allergy-the Melbourne experience. *Contact Dermatitis* 65: 38-42.

Slominski, A., Tobin, J. D. et al. (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews* 84: 1155-1228.

Solomon, M. J., Varshavsky, A. (1985). Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 6470-6474.

Speit, G., Schütz, P. et al. (2000). Induction and repair of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks in repair-deficient human cell lines. *Mutagenesis* 15: 85-90.

Spivak, G., Hanawalt, P. C. (2006). Host cell reactivation of plasmids containing oxidative DNA lesions is defective in Cockayne syndrome but normal in UV-sensitive syndrome fibroblasts. *DNA Repair* 5: 13-22.

Sugasawa, K., Okuda, Y. et al. (2005). UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 121: 387-400.

Sugasawa, K. (2009). UV-DDB: A molecular machine linking DNA repair with ubiquitination. *DNA Repair* 8: 969-972

Sun, N. K., Sun, C. L. et al. (2010). Damaged DNA-binding protein 2 (DDB2) protects against UV irradiation in human cells and *Drosophila*. *Journal of Biomedical Science* 17: 27.

Swenberg, J. A., Kerns, W. D. et al. (1980). Induction of squamous cell carcinomas of the rat nasal cavity by inhalation exposure to formaldehyde vapor. *Cancer Research* 40: 3398-3402.

Swenberg, J. A. et al. (2010). Endogenous versus exogenous DNA adducts: their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment. *Toxicological Sciences* 120: 130-145.

Testino, G., Borro, P. (2010). Alcohol and gastrointestinal oncology. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 2: 322-325.

Tuthill, R. W. (1984). Woodstoves, formaldehyde and respiratory disease. *American Journal of Epidemiology* 120: 952-955.

Watson, W., Kapur, S. (2011). Atopic dermatitis. *Allergy Asthma & Clinical Immunology* 7: Suppl 1: S4

Wittschieben, B., Iwai, S. et al. (2005). DDB1-DDB2 (Xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound lesions in DNA. *Journal of Biological Chemistry* 280: 39982-39989.

Zhang, L., Tang, X. et al. (2010). Occupational exposure to formaldehyde, hematotoxicity, and leukemia-specific chromosome changes in cultured myeloid progenitor cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 19: 80-88.

7. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bedanken bei:

Prof. Dr. Hanspeter Naegeli für die kompetente Unterstützung, die konstruktiven Vorschlägen und für das Referat.

PD DR. Andreas Luch für das Koreferat.

Dr. med. vet. Flurina C. Clement Frey für die gute Zusammenarbeit, die fachliche Unterstützung während der letzten 18 Monate und für die Freundschaft.

Dr. med. vet. Renée Robel für die geleistete Vorarbeit dieser Studie.

Dem ZMB (the center of Microscopy and Image Analysis), im speziellen Claudia Dumrese, für die Einführung und technische Unterstützung während meinen FRAP-Experimenten.

Der Naegeli-Gruppe und dem ganzen Institut für die hilfreichen Diskussionen und die kollegiale Unterstützung im Labor.

Meinen Eltern, Barbara und Peter, ohne die ein Studium und eine anschliessende Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Und zuletzt bedanke ich mich bei meinem Mann Thomas für die menschliche Unterstützung während den letzten Monaten.

8. Curriculum vitae

Name, Vornamen	Meier Wartberger, Regula Simone
Geburtsdatum	7. Juni 1981
Geburtsort	Arbon TG
Nationalität	Schweiz
Heimatort	Kirchberg SG und Mettauertal AG
Ausbildung	
1988-1994	Primarschule, Arbon TG, Schweiz
1994-1997	Sekundarschule, Arbon TG, Schweiz
1997-1999	Diplommittelschule, Romanshorn TG, Schweiz
2000-2003	Thurgauisch-Schaffhauserische Maturitätsschule für Erwachsene, Romanshorn TG, Schweiz
Jul. 2003	Maturitätsdiplom Kantonsschule Romanshorn TG, Schweiz
Okt. 2003-Okt. 2009	Studium der Veterinärmedizin an der Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich, Schweiz Schwerpunkt „Kleintiere“
Okt. 2009	Staatsexamen Veterinärmedizin Universität Zürich, Schweiz
2009-2011	Anfertigung der Dissertation unter der Leitung von Prof. Hanspeter Naegeli am Departement für Veterinärpharmakologie und-toxikologie der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich, Schweiz Direktor: Prof. Dr. Felix R. Althaus
2012-heute	Assistentin in der Tierarztpraxis im Hölzli in Amriswil TG, Schweiz